

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**Departamento de Nutrición, Bromatología
y Tecnología de los Alimentos**



**DESARROLLO DE ESTRATEGIAS MOLECULARES QUE
PERMITAN EL USO DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS (BAL)
COMO FACTORÍAS CELULARES DE PRODUCCIÓN DE
PÉPTIDOS BIOACTIVOS DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA
ALIMENTARIA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Loreto Gútiez Sainz-Pardo

Bajo la dirección de los doctores

**Pablo E. Hernández Cruza
Carmen Herranz Sorribes
Luis M. Cintas Izarra**

MADRID, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



**DESARROLLO DE ESTRATEGIAS MOLECULARES QUE
PERMITAN EL USO DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS
(BAL) COMO FACTORÍAS CELULARES DE
PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS DE
INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA**

TESIS DOCTORAL

LORETO GÚTIEZ SAINZ-PARDO

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA
Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**DESARROLLO DE ESTRATEGIAS MOLECULARES QUE
PERMITAN EL USO DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS
(BAL) COMO FACTORÍAS CELULARES DE
PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS DE
INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA**

Memoria que, para optar al título de Doctor con mención honorífica de
“Doctorado Europeo”, presenta la Licenciada Loreto Gútiez Sainz-Pardo

Madrid, 13 de marzo de 2013



Departamento de Nutrición, Bromatología
y Tecnología de los Alimentos
Facultad de Veterinaria
Universidad Complutense de Madrid

Ciudad Universitaria , s/n.
28040 Madrid
Teléfono: +34-91-394 3749
Fax: +34-91-394 3743

PABLO E. HERNÁNDEZ CRUZA, CARMEN HERRANZ SORRIBES Y LUIS M. CINTAS IZARRA, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD, PROFESORA CONTRATADA DOCTORA Y PROFESOR TITULAR DE UNIVERSIDAD, RESPECTIVAMENTE, DEL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “ Desarrollo de estrategias moleculares que permitan el uso de las bacterias lácticas (BAL) como factorías celulares de producción de péptidos bioactivos de interés en la industria alimentaria”, de la que es autora la Licenciada en Biología **D^a Loreto Gútiérrez Sainz-Pardo**, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección conjunta de los que suscriben y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor con mención honorífica de “Doctorado Europeo”.

Madrid, 13 de marzo de 2013.

Los Directores de la Tesis Doctoral,

Pablo E. Hernández Cruza

Carmen Herranz Sorribes

Luis M. Cintas Izarra

A mis padres y hermana.
A Carlos.
En memoria de mis abuelos y mi tío Javier.

Quisiera dar las gracias a todas las personas que, de una manera u otra, han contribuido a la realización de esta Tesis Doctoral, así como a todas aquellas a las que he tenido la oportunidad de conocer durante los años dedicados a este trabajo investigador.

A Los Prof. Lorenzo de la Hoz Perales y María Dolores Selgas Cortecero, Directores del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos durante la realización de este trabajo investigador, por acogerme en el Departamento, por la ayuda recibida y por la amabilidad con la que me han tratado siempre.

De manera muy especial me gustaría expresar mi gratitud a mis directores de tesis Pablo E. Hernández Cruza, Carmen Herranz Sorribes y Luis M. Cintas Izarra por acogerme en su grupo de trabajo y permitirme comprobar que el mundo de la ciencia es todo lo apasionante que había imaginado, por confiar en mí desde el primer momento y por la ayuda recibida durante la realización de esta tesis. Gracias por compartir esta experiencia con vosotros, por vuestro apoyo incondicional, cariño y profesionalidad.

Gracias a todas las personas que han hecho que ir cada mañana a nuestro laboratorio “punto LAB” fuera para mí un placer. Sólo compartir estos años con vosotros ha hecho que esta Tesis merezca la pena. A Bea, por ayudarme y acogerme cuando sólo era una recién llegada, por tu generosidad y disposición a ayudar a quien lo necesitase. Además de ser una trabajadora incansable nunca permites que el desaliento pueda contigo. A mis compañeros de alegrías y penas: Juan, Juanjo y Cris; tantos años han dado para mucho, así que más que compañeros os considero amigos. Juan, por todo lo que me has ayudado, por todo lo que nos hemos reído, porque te admiro como científico, por ser el que ponía un poco de cordura y orden, mil gracias. Juanjo, qué puedo decir... hemos compartido tantas horas, tantas conversaciones trascendentales, nos hemos ayudado en los malos momentos y hemos compartido los buenos, así que lo que dijese aquí quedaría corto. Cristina, gracias por escucharme, por apoyarme y por comprenderme. Gracias por haber soportado mis incertidumbres y por tu perpetua sonrisa. Eres una excelente persona. A Estefanía, Carlos y Sara las últimas incorporaciones, por hacer aún más divertido el trabajo en el laboratorio. Estefanía, ser testigo de tu afán de superación me ha servido como ejemplo en los momentos en los que me fallaban un poco las fuerzas. Carlinhos, has traído la alegría y el buen humor y, de corazón te digo, que has hecho que las tardes interminables en el laboratorio fueran infinitamente más llevaderas, mil gracias por todo. Sara, el presente de “punto LAB”, a ti más que a nadie tengo que agradecer completar esta tesis desde la distancia. Te estoy muy agradecida por lo que has hecho por mí. Finalmente, a todos los que habéis pasado en algún momento por nuestro laboratorio: a Jorge y Antonio, casi doctores cuando llegué y que me hicieron imaginar cómo serían las etapas finales de este proceso; a Maliko, Tereza, Andreia, Clara, Yoshimitsu, Agustín, Asun y, especialmente, y con gran cariño a Yanina. Muchas gracias a todos, de todos he aprendido a ser cada día mejor.

También quiero dar las gracias a los demás miembros del Departamento que, de una u otra manera, han hecho posible esta Tesis Doctoral. Gracias a Charo por su amabilidad, atenciones y consejos que siempre he apreciado. A Juan Miguel por su buen humor y disposición para ayudar. A Fernanda, Teresa, Isabel, Paloma, María y Ana por su ayuda cuando la he necesitado y por hacer del Departamento un lugar mucho más agradable. A los compañeros “del laboratorio del fondo” con los que he compartido momentos fantásticos fuera y dentro del laboratorio y a los que tengo que agradecer siempre su generosa ayuda: Violeta, María, Miguel Ángel, Nicolette, Silvia, Alicia, Inés, Almudena, Eugenia... voy a echaros de menos, será difícil volver a encontrar tanta buena gente junta. A “los del laboratorio de al lado”: Esther, Virginia, Maldo, Susana, Arantxa, Marta, Rebeca, Irene... de todos he aprendido y con todos he

compartido buenos momentos. Por supuesto, no podría dejar de acordarme de Aurora, Santiago, Alberto, Rosi... gracias de corazón a todos.

No puedo dejar de agradecer a la Dra. Marisi Recio del IFI-CSIC (Instituto de Fermentaciones Industriales-CSIC) su inestimable ayuda al permitirme disponer de equipamientos experimentales imprescindibles para que este trabajo llegara a buen puerto y a todo su equipo, en especial a la ya Dra. María del Mar Contreras, por su generosa ayuda. También agradezco de todo corazón a la Dra. Rosa del Campo, del Hospital Universitario Ramón y Cajal la enorme ayuda prestada y a Merche su dedicación y simpatía. Me siento enormemente gratificada por vuestra ayuda y generosidad.

Thanks to Prof. Jeanette Otte (Food Chemistry Laboratory, Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark) and to Prof. Ingolf F. Nes (Laboratory of Microbial Gene Technology, Department of Chemistry, Biotechnology and Food Science, Norwegian University of Life Sciences, Ås, Norway) for hosting me in their laboratories and for their supervision and help. Thanks to Prof. Finn Vogensen and Prof. Dzung B. Diep for his enthusiasm, patience and brilliant ideas and to Dr. Morten Skaugen for his invaluable help. Also, thanks to all the PhD students and lab technicians that I met in Denmark and Norway. I had really good experiences during the time I spent with you. Finally, I want to thank all the people that made me feel at home even though home was so far away; special thanks to Carmen and Yuko, you are great!

Igualmente, quisiera agradecer al Programa CENIT (Consortios Estratégicos Nacionales de Investigación Técnica) del MIT-CDTI (Ministerio de Industria, Turismo y Comercio y Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial) y a la empresa INNAVES, S.A. la oportunidad de incorporarme al mundo de los péptidos bioactivos derivados de proteínas alimentarias. Gracias también al Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) por la concesión de una Beca Predoctoral del Programa Nacional de Formación del Profesorado Universitario (FPU), así como las Ayudas para Estancias Investigadoras Cortas en la Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen (Denmark) y en la Norwegian University of Life Sciences, Ås (Norway). Asimismo, el trabajo investigador realizado ha sido posible gracias a los fondos del proyecto CENIT (2006-2009) del MITC-CDTI, de la Comunidad de Madrid (CAM, Proyectos S-505/AGR/0265 y S2009/AGR-1489), del Banco Santander Central Hispano – Universidad Complutense de Madrid (BSCH-UCM, proyectos GR58/08 y GR35-10-A), del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, proyecto AGL2009-08348) y del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO, proyecto AGL2012-34829).

A mis amigas del alma Patri, Silvia, María y Chío, gracias por escucharme, animarme, apoyarme... por haber estado conmigo en este largo viaje y por ayudarme a llegar al final. A Cinthia y Jacob, gracias por subirme la moral cuando lo necesitaba, por ayudarme a desconectar, por darme tan buenos momentos, por hacerme sentir orgullosa de mi misma y de tener estos amigos. A mis niñas, mis incondicionales, las mejores: Ana, Bea, Irene, Inma, Jackie, Kika, Neus, Susana que tantas veces me han preguntado “¿pero tú qué es lo que haces? ¿cuándo terminas la tesis?”. Por fin ha llegado el día, gracias por estar conmigo durante este proceso y esperar con ilusión el final. A Concha y a Leti por vivir conmigo los momentos finales y ser un apoyo inestimable. Gracias, gracias, gracias a todos mis amigos. Sois, sin excepción, gente maravillosa. No sabéis lo importantes que habéis sido para mí.

A mi familia, por creer en mí y estar a mi lado en todo momento. Sé que ha habido momentos en los que soportarme ha resultado ser una tarea especialmente difícil. A mis padres José y Carmucha, que tanto han hecho por mí, que son mi referencia y el mejor ejemplo a seguir. Por vuestro continuo cariño y preocupación, por empujarme a superarme día a día. Soy quien soy gracias a vosotros, lo que tengo os lo

debo a vosotros, mis logros son vuestros logros. A mi hermana Alejandra, porque también soy quien soy gracias a ti, porque sé que te has alegrado por mí y has sufrido por mí y porque, como hermana mayor, quiero ser un buen referente para ti y eso me ha servido de estímulo cuando los ánimos flaqueaban. Gracias Aidin, por tu paciencia infinita y por acogerme cuando lo he necesitado. Gracias a mis abuelos por quererme tanto, sé que estarían muy orgullosos de mí. Gracias también a mi tío Javier, por todo. Siempre te tendré presente.

A Carlos, por tu apoyo incondicional, por hacer que quiera dar lo mejor de mí misma, por hacer que las alegrías sean más alegrías y las pequeñas frustraciones más llevaderas. Por ayudarme a no perder el norte, por enseñarme que quejarse no lleva a ninguna parte, por ser la persona más positiva que conozco y compartirlo a mi lado, por haber estado siempre conmigo, por comprenderme y, porque sin ti, no lo habría conseguido. Gracias por todo.

Espero no haberme olvidado de nadie pero, si así fuera, no me lo tengáis en cuenta porque a todos los compañeros, amigos y familiares que habéis contribuido a que llegue este feliz día os estoy inmensamente agradecida.

Índice

	Pág.
CAPÍTULO 1 / CHAPTER 1	1
EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR Y DE LOS OBJETIVOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN	3
GENERAL ACCOUNT OF THE OBJECTIVES AND AIMS OF THE RESEARCH PROBLEM	7
CAPÍTULO 2	11
INTRODUCCIÓN GENERAL	13
2.1. ALIMENTOS FUNCIONALES	13
2.2. PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS BIOACTIVOS DE ORIGEN LÁCTEO	15
2.2.1. LA LECHE	15
2.2.1.1. Caseínas	17
2.2.1.2. Proteínas del suero	17
2.2.2. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LOS PÉPTIDOS LÁCTEOS	18
2.3. LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL	19
2.3.1. VÍAS METABÓLICAS ASOCIADAS CON EL CONTROL DE LA PRESIÓN ARTERIAL	20
2.3.1.1. El sistema cinina-óxido nítrico	20
2.3.1.2. El sistema de la endopeptidasa neutra y la enzima convertidora de la endotelina	20
2.3.1.3. Péptidos natriuréticos	21
2.3.1.4. Sistema renina-angiotensina (SRA)	21
2.3.2. INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE LA ANGIOTENSINA (ECA)	22
2.3.2.1. Ensayos de inhibición de la ECA <i>in vitro</i>	23
2.3.2.2. Determinación de la actividad antihipertensiva <i>in vivo</i> de los péptidos inhibidores de la ECA <i>in vitro</i>	24
2.3.2.3. Relación estructura/actividad de los péptidos inhibidores de la ECA	25
2.4. OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS LÁCTEOS CON ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA ECA (AI-ECA) Y/O ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA	26
2.4.1. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	27
2.4.1.1. Hidrolizados de caseínas	27
2.4.1.2. Hidrolizados de proteínas del suero lácteo	30
2.4.2. PRESENCIA DE PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA ECA (AI-ECA) EN PRODUCTOS LÁCTEOS FERMENTADOS	32
2.4.2.1. Leches fermentadas	32
2.4.2.2. Quesos	35
2.4.3. ESTUDIOS CLÍNICOS EN HUMANOS	36
2.5. BACTERIAS LÁCTICAS	38
2.5.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y CONSIDERACIONES TAXONÓMICAS	38

2.5.2. BACTERIAS LÁCTICAS Y ALIMENTOS	39
2.5.2.1. Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas	41
2.5.3. BACTERIAS LÁCTICAS Y SALUD	43
2.5.3.1. Las bacterias lácticas como cultivos probióticos	43
2.5.3.2. Bacterias lácticas y enfermedad	44
2.5.4. SISTEMA PROTEOLÍTICO DE LAS BACTERIA LÁCTICAS	44
2.5.4.1. Proteinasas	45
2.5.4.2. Sistemas específicos de transporte de péptidos	46
2.5.4.3. Peptidasas	47
2.5.4.4. Regulación del sistema proteolítico de las bacterias lácticas	48
2.5.5. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS POR BACTERIAS LÁCTICAS	48
 2.6. <u>EL GÉNERO <i>Enterococcus</i></u>	 50
2.6.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y CONSIDERACIONES TAXONÓMICAS	50
2.6.2. LOS ENTEROCOCOS COMO MICROORGANISMOS PATÓGENOS	52
2.6.2.1. Resistencia a antibióticos	54
2.6.2.2. Factores de virulencia	55
2.6.2.2.1. <u>Sustancia de agregación</u>	56
2.6.2.2.2. <u>Proteína de superficie de enterococos</u>	57
2.6.2.2.3. <u>Adhesinas</u>	58
2.6.2.2.4. <u>Citolisina o hemolisina β</u>	60
2.6.2.2.5. <u>Gelatinasa y serina proteasa</u>	61
2.6.3. LOS ENTEROCOCOS COMO CULTIVOS INICIADORES Y PROBIÓTICOS	62
 CAPÍTULO 3 / CHAPTER 3	 65
PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS INHIBIDORES DE LA ECA Y OTROS PÉPTIDOS BIOACTIVOS POR CEPAS DE <i>Enterococcus faecalis</i> DE ORIGEN ALIMENTARIO, AMBIENTAL Y CLÍNICO DURANTE SU DESARROLLO EN LECHE DESNATADA DE VACA	
<i>Enterococcus faecalis</i> STRAINS FROM FOOD, ENVIRONMENTAL, AND CLINICAL ORIGIN PRODUCE ACE-INHIBITORY PEPTIDES AND OTHER BIOACTIVE PEPTIDES DURING THEIR GROWTH IN BOVINE SKIM MILK	
 ABSTRACT	 67
 3.1. INTRODUCTION	 69
 3.2. MATERIALS AND METHODS	 69
3.2.1. Microbial strains and growth conditions	69
3.2.2. Determination of the ACE-inhibitory activity (ACE-IA)	72
3.2.3. Analysis of the BSM-derived hydrolysates by on-line reversed-phase high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (RP-HPLC-MS/MS)	72
3.2.4. Determination of the antimicrobial activity	73

3.2.5. Detection of potential virulence factors	73
3.2.6. Detection of biogenic amines genes	73
3.2.7. Antibiotic susceptibility testing	73
3.2.8. Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) and Multilocus Sequence Typing (MLST) analysis	73
3.2.9. Effect of temperature, and time of growth on the ACE-inhibitory activity (ACE-IA) and identification of the ACE-inhibitory peptides (ACE-IP)	74
3.3. RESULTS	74
3.3.1. Growth of selected lactic acid bacteria (LAB) in bovine skim milk (BSM), determination of its ACE-inhibitory activity (ACE-IA) and identification of the major peptide fragments	74
3.3.2. Antimicrobial activity of supernatants of different <i>E. faecalis</i> strains	77
3.3.3. Virulence determinants and antibiotic resistance	77
3.3.4. Genetic relatedness of the <i>E. faecalis</i> strains	79
3.3.5. Effect of time and temperature of growth on the ACE-IA and production of ACE-IP by <i>E. faecalis</i> strains from food, environmental and clinical origin	79
3.4. DISCUSSION	81
3.5. AKNOWLEDGEMENTS	85
3.6. REFERENCES	86
CAPÍTULO 4 / CHAPTER 4	91
CONTROL DE LA LISIS CELULAR DE CEPAS RECOMBINANTES DE <i>Lactococcus lactis</i> MEDIADA POR LA ENTEROLISINA A Y PRODUCCIÓN DE HIDROLIZADOS LÁCTEOS DERIVADOS DE LECHE DESNATADA DE VACA CON ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA ECA	
CONTROLLED ENTEROLYSIN A-MEDIATED LYSIS AND PRODUCTION OF ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME (ACE)-INHIBITORY BOVINE SKIM MILK HYDROLYSATES BY RECOMBINANT <i>Lactococcus lactis</i>	
ABSTRACT	93
4.1. INTRODUCTION	95
4.2. MATERIALS AND METHODS	96
4.2.1. Bacterial strains, plasmids and growth conditions	96
4.2.2. Basic genetic techniques and enzymes	96
4.2.3. PCR amplification and nucleotide sequencing	96
4.2.4. Construction of the pMSP3545-derived recombinant plasmid pMLG2	97
4.2.5. Production of enterolysin A by the recombinant <i>L. lactis</i> cells	97
4.2.6. Determination of the ACE-inhibitory activity (ACE-IA) of the BSM-derived culture supernatants	97
4.2.7. Analysis of the BSM-derived culture supernatants by reversed-phase high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (RP-HPLC-MS/MS)	97

4.3. RESULTS AND DISCUSSION	98
4.4. CONCLUSIONS	102
4.5. AKNOWLEDGEMENTS	103
4.6. REFERENCES	103
CAPÍTULO 5 / CHAPTER 5	107
EVIDENCIA GENÉTICA Y BIOQUÍMICA DE QUE CEPAS RECOMBINANTES DE <i>Enterococcus</i> spp. QUE EXPRESAN LA GELATINASA (GelE), PRODUCIDA POR <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i> DBH18, PRODUCEN HIDROLIZADOS LÁCTEOS DERIVADOS DE LA LECHE DESNATADA DE VACA CON ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE LA ANGIOTENSINA (ECA) Y PÉPTIDOS ANTIHIPERTENSIVOS	
GENETIC AND BIOCHEMICAL EVIDENCE THAT RECOMBINANT <i>Enterococcus</i> spp. STRAINS, EXPRESSING THE GELATINASE (GelE), PRODUCED BY <i>Enterococcus faecalis</i> DBH18, PRODUCE BOVINE SKIM MILK-DERIVED HYDROLYSATES WITH ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME (ACE)-INHIBITORY ACTIVITY AND ANTIHYPERTENSIVE PEPTIDES	
ABSTRACT	109
5.1. INTRODUCTION	111
5.2. MATERIALS AND METHODS	112
5.2.1. Bacterial strains, plasmids and culture conditions	112
5.2.2. Determination of gelatin and bovine caseins hydrolysis by different <i>E. faecalis</i> strains	114
5.2.3. Basic genetic techniques and enzymes	114
5.2.4. PCR amplification and nucleotide sequencing	114
5.2.5. Recombinant plasmids derived from pMG36c	114
5.2.6. Construction and characterization of a gelatinase (gelE) deletion (knockout) mutant of <i>E. faecalis</i> V583	115
5.2.7. Determination of the ACE-inhibitory activity (ACE-IA)	116
5.2.8. Analysis of the BSM-derived hydrolysates by reversed-phase high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (RP-HPLC-MS/MS)	116
5.3. RESULTS	117
5.3.1. Hydrolysis of gelatin and bovine milk caseins by <i>E. faecalis</i> strains from different origins	117
5.3.2. Heterologous production and functional expression of GelE and SprE by recombinant <i>Enterococcus</i> spp. strains	117
5.3.3. ACE-inhibitory activity of recombinant <i>Enterococcus</i> spp. strains grown in bovine skim milk (BSM)	119
5.3.4. Major peptide fragments and identification of ACE-inhibitory peptides (ACE-IP) in supernatants of the recombinant <i>Enterococcus</i> spp. strains grown in	120

bovine skim milk (BSM)	
5.4. DISCUSSION	123
5.5. AKNOWLEDGEMENTS	126
5.6. REFERENCES	127
CAPÍTULO 6 / CHAPTER 6	131
PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE PROTEASAS POR BACTERIAS LÁCTICAS (BAL) Y LEVADURAS: <i>Lactobacillus casei</i> CECT475 QUE EXPRESA LA GELATINASA (GelE), PRODUCIDA POR <i>Enterococcus faecalis</i> DBH18, LIBERA PÉPTIDOS INHIBIDORES DE LA ECA DURANTE SU DESARROLLO EN LECHE DESNATADA DE VACA	
HETEROLOGOUS EXPRESSION OF PROTEASES BY LACTIC ACID BACTERIA (LAB) AND YEASTS: <i>Lactobacillus casei</i> CECT475 EXPRESSING THE GELATINASE (GelE), PRODUCED BY <i>Enterococcus faecalis</i> DBH18, RELEASES ACE-INHIBITORY PEPTIDES DURING GROWTH IN BOVINE SKIM MILK	
ABSTRACT	133
6.1. INTRODUCTION	135
6.2. MATERIALS AND METHODS	136
6.2.1. Bacterial strains, culture conditions, plasmids, and general genetic techniques	136
6.2.2. Growth of the recombinant LAB strains in bovine skim milk (BSM)	138
6.2.3. Determination of the ACE-inhibitory activity (ACE-IA)	138
6.2.4. Analysis of the BSM-derived hydrolysates by reversed-phase high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (RP-HPLC-MS/MS)	138
6.2.5. ELISA for detection and quantification of the LHLPLP antihypertensive peptide	139
6.2.6. Cloning of gelE in <i>P. pastoris</i> X-33A and <i>K. lactis</i> GG799	139
6.3. RESULTS	141
6.3.1. Caseinolytic activity, growth characteristics, and ACE-inhibitory activity (ACE-IA) of the recombinant LAB strains grown in bovine skim milk (BSM)	141
6.3.2. Peptide profiles and identification of major peptide fragments in BSM-derived hydrolysates of <i>Lb. casei</i> CECT475 (pCG) and <i>Lb. casei</i> CECT475 (pCGSP)	143
6.3.3. Detection and quantification of the antihypertensive peptide LHLPLP produced by the recombinant <i>Lb. casei</i> CECT475 derivatives	146
6.3.4. Caseinolytic and proteolytic activity of the recombinant <i>P. pastoris</i> X-33GE, <i>P. pastoris</i> X-33MGE and <i>K. lactis</i> GG799GE	147
6.4. DISCUSSION	147

6.5. AKNOWLEDGEMENTS	150
6.6. REFERENCES	150
CAPÍTULO 7 / CHAPTER 7	155
LA GELATINASA (GelE) PURIFICADA LIBERA PÉPTIDOS INHIBIDORES DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE LA ANGIOTENSINA (ECA) POR HIDRÓLISIS DE LA LECHE DESNATADA DE VACA	
<i>PURIFIED GELATINASE (GelE) RELEASES ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME (ACE)-INHIBITORY PEPTIDES FROM BOVINE SKIM MILK</i>	
ABSTRACT	157
7.1. INTRODUCTION	159
7.2. MATERIALS AND METHODS	160
7.2.1. Bacterial strains and culture conditions	160
7.2.2. Production of gelatinase (GelE) and determination of the gelatinase activity	160
7.2.3. Purification of GelE	161
7.2.4. Determination of the ACE-inhibitory activity (ACE-IA) of the bovine skim milk (BSM)-derived hydrolysates	161
7.2.5. Analysis of the BSM-derived hydrolysates by MALDI-TOF/MS analysis	162
7.2.6. ELISA for detection and quantification of the LHLPLP antihypertensive peptide	162
7.3. RESULTS	163
7.3.1. Growth and proteolytic activity of <i>E. faecalis</i> DBH18 and <i>Lb. casei</i> CECT475 (pCG)	163
7.3.2. Purification of GelE and MALDI-TOF/MS analysis	164
7.3.3. ACE-inhibitory activity of the bovine skim milk (BSM)-derived hydrolysates	167
7.3.4. Peptide profiles and identification of major peptide fragments in the BSM-derived hydrolysates	168
7.3.5. Detection and quantification of the antihypertensive peptide LHLPLP	170
7.4. DISCUSSION	170
7.5. AKNOWLEDGEMENTS	173
7.6. REFERENCES	173
CAPÍTULO 8	177
RESULTADOS Y DISCUSIÓN GENERAL	
<u>8.1. PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS INHIBIDORES DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE LA ANGIOTENSINA (ECA) Y OTROS PÉPTIDOS BIOACTIVOS POR CEPAS DE <i>Enterococcus faecalis</i> DE ORIGEN ALIMENTARIO, AMBIENTAL Y CLÍNICO DURANTE SU DESARROLLO EN LECHE DESNATADA DE VACA</u>	179

8.1.1. Desarrollo de las bacterias lácticas (BAL) en leche desnatada de vaca (LDV), determinación de su actividad inhibidora de la ECA (AI-ECA) e identificación de los fragmentos peptídicos mayoritarios	180
8.1.2. Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes libres de células de diversas cepas de <i>E. faecalis</i>	181
8.1.3. Factores de virulencia y de resistencia a antibióticos	182
8.1.4. Similitud e identidad genética de las cepas de <i>E. faecalis</i> evaluadas	183
8.1.5. Efecto del tiempo y temperatura en la producción de hidrolizados lácteos con AI-ECA y en la liberación de PI-ECAs por diversas cepas de <i>E. faecalis</i>	184
8.2. <u>PRODUCCIÓN CONTROLADA DE LA ENTEROLISINA A (EnIA) Y LISIS CELULAR PROGRAMADA DE CÉLULAS RECOMBINANTES DE <i>Lactococcus lactis</i>, COMO ESTRATEGIA PARA LA OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS LÁCTEOS, DERIVADOS DE LA LECHE DESNATADA DE VACA, CON ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE LA ANGIOTENSINA (ECA)</u>	186
8.2.1. Construcción del plásmido pMLG2, derivado del vector de expresión proteica pMSP3545 y producción heteróloga de la enterolisina A (EnIA)	186
8.2.2. Determinación de la AI-ECA y del perfil peptídico de los hidrolizados lácteos generados tras la lisis inducida de los cultivos recombinantes de <i>L. lactis</i> , productores de enterolisina A (EnIA), e identificación de los péptidos mayoritarios liberados	188
8.3. <u>EVIDENCIA GENÉTICA Y BIOQUÍMICA DE QUE CEPAS RECOMBINANTES DE <i>Enterococcus</i> spp. QUE EXPRESAN LA GELATINASA (GelE), PRODUCIDA POR <i>E. faecalis</i> DBH18, PRODUCEN HIDROLIZADOS LÁCTEOS DERIVADOS DE LA LECHE DESNATADA DE VACA CON ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE LA ANGIOTENSINA (ECA) Y PÉPTIDOS ANTIHIPERTENSIVOS</u>	191
8.3.1. Hidrólisis de la gelatina y de caseínas de la leche desnatada de vaca (LDV) por <i>E. faecalis</i> de diversos orígenes	191
8.3.2. Producción heteróloga y expresión funcional de la gelatinasa (GelE) y la serina proteasa (SprE), producidas por <i>E. faecalis</i> DBH18, por cepas recombinantes de <i>Enterococcus</i> spp.	192
8.3.3. Actividad inhibidora de la ECA de los hidrolizados lácteos generados por el desarrollo de las cepas recombinantes de <i>Enterococcus</i> spp. en leche desnatada de vaca (LDV)	194
8.3.4. Identificación de los fragmentos peptídicos mayoritarios y de péptidos inhibidores de la ECA (PI-ECAs) en los hidrolizados lácteos de las cepas recombinantes de <i>Enterococcus</i> spp., desarrolladas en leche desnatada de vaca (LDV)	194
8.4. <u>PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE PROTEASAS POR BACTERIAS LÁCTICAS (BAL) Y LEVADURAS: <i>Lactobacillus casei</i> CECT475 (pCG), QUE EXPRESA LA GELATINASA (GelE) DE <i>E. faecalis</i> DBH18, LIBERA PÉPTIDOS INHIBIDORES DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE LA ANGIOTENSINA (ECA) DURANTE SU DESARROLLO EN LECHE DESNATADA DE VACA</u>	197
8.4.1. Actividad caseinólítica, desarrollo de las bacterias lácticas (BAL)	197

recombinantes en leche desnatada de vaca (LDV) y determinación de la actividad inhibidora de la ECA de los hidrolizados lácteos resultantes	
8.4.2. Determinación de los perfiles peptídicos e identificación de los fragmentos peptídicos mayoritarios de los hidrolizados lácteos derivados del desarrollo de <i>Lb. casei</i> CECT475 (pCG) y <i>Lb. casei</i> CECT475 (pCGSP) en leche desnatada de vaca (LDV)	199
8.4.3. Detección y cuantificación del péptido antihipertensivo LHLPLP producido por las cepas recombinantes de <i>Lb. casei</i> CECT475	200
8.4.4. Actividad caseinolítica y proteolítica de las levaduras recombinantes <i>P. pastoris</i> X-33GE, <i>P. pastoris</i> X-33MGE y <i>K. lactis</i> GG799GE	201
8.5. LA GELATINASA (GeIE) PURIFICADA PRODUCE PÉPTIDOS INHIBIDORES DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE LA ANGIOTENSINA (ECA) POR HIDRÓLISIS DE LA LECHE DESNATADA DE VACA	203
8.5.1. Desarrollo en diversos medios de cultivo y determinación de la actividad proteolítica de <i>E. faecalis</i> DBH18 y <i>Lb. casei</i> CECT475 (pCG)	203
8.5.2. Purificación de la GeIE y análisis de las fracciones purificadas por MALDI-TOF/MS	204
8.5.3. Actividad inhibidora de la ECA de hidrolizados lácteos derivados de leche desnatada de vaca (LDV)	205
8.5.4. Determinación de los perfiles peptídicos e identificación de los fragmentos peptídicos mayoritarios presentes en los hidrolizados lácteos derivados de leche desnatada de vaca (LDV)	206
8.5.5. Detección y cuantificación del péptido antihipertensivo LHLPLP en los hidrolizados lácteos derivados de la digestión de la LDV con la GeIE purificada de <i>E. faecalis</i> DBH18 o <i>Lb. casei</i> CECT475 (pCG)	207
CAPÍTULO 9 / CHAPTER 9	209
CONCLUSIONES	211
CONCLUSIONS	213
CAPÍTULO 10	215
TRABAJO FUTURO	
RESUMEN / SUMMARY	221
RESUMEN	223
Introducción	223
Objetivos	224
Resultados	224
Conclusiones	227
Bibliografía	229
SUMMARY	231
Introduction	231

<i>Objectives</i>	232
<i>Results</i>	232
<i>Conclusions</i>	235
<i>References</i>	236
BIBLIOGRAFÍA	239
APÉNDICES	267
APÉNDICE 1: LISTADO DE ABREVIATURAS	269
APÉNDICE 2: LISTADO DE TABLAS	272
APÉNDICE 3: LISTADO DE FIGURAS	274
APÉNDICE 4: CÓDIGO GENÉTICO	278

CAPÍTULO *CHAPTER*

1

**Exposición general del problema a
investigar y de los objetivos del trabajo
de investigación**

***General account of the objectives and
aims of the research problem***

Durante los últimos años se ha sugerido que la ingestión y consumo de péptidos de origen alimentario puede ser beneficioso para la salud y que su empleo por la industria alimentaria puede mejorar la calidad y seguridad de los alimentos consumidos. Actualmente se conoce la existencia de péptidos con actividades biológicas, denominados péptidos bioactivos, entre los que destacan aquellos con actividad antimicrobiana, antihipertensiva, antitrombótica, antihipercolesterolemia, inmunomoduladora, antioxidante y otras. Los péptidos bioactivos se encuentran encriptados en la secuencia aminoacídica de muchas proteínas alimentarias siendo necesaria su hidrólisis para su liberación y activación. Por ello, los péptidos bioactivos se liberan de sus precursores proteínicos u oligopeptídicos por: (i) hidrólisis gastrointestinal; (ii) el uso de enzimas proteolíticas purificadas; o (iii) la fermentación de proteínas, sobre todo de origen lácteo, por el sistema proteolítico de las bacterias lácticas (BAL). Entre los péptidos bioactivos cabe destacar aquellos con actividad antihipertensiva dada la importancia de la hipertensión como factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y renales, de elevada incidencia en los países desarrollados. La actividad antihipertensiva de los péptidos bioactivos puede ser evaluada tanto por la inhibición *in vitro* de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), una enzima reguladora clave del sistema renina-angiotensina importante para la regulación fisiológica de la presión arterial, como por la reducción *in vivo* de la tensión arterial de ratas espontáneamente hipertensas (SHR).

Por otra parte, las empresas alimentarias se enfrentan a la demanda por los consumidores de productos más saludables, listos para su consumo, poco procesados y con menos aditivos químicos. Por ello, la existencia en el mercado de productos alimentarios enriquecidos con péptidos bioactivos permitiría su uso con fines preventivos frente a patologías como las enfermedades cardiovasculares. En este contexto, las BAL comúnmente empleadas en la industria alimentaria como cultivos iniciadores para la obtención de productos fermentados suponen una alternativa interesante para la producción de péptidos bioactivos derivados de proteínas alimentarias. Las BAL empleadas como cultivos iniciadores poseen, en general, un sistema proteolítico que durante el proceso fermentativo hidroliza y degrada las proteínas de la leche, principalmente las caseínas, para liberar los péptidos y aminoácidos que constituyen la fuente de nitrógeno esencial para su desarrollo. En general, la degradación de las caseínas por las BAL se inicia con la hidrólisis de estas proteínas por una proteinasa ligada a la pared celular (PPC) y la liberación de un gran número de oligopéptidos. A continuación, los oligopéptidos derivados de las caseínas se transportan al interior celular por sistemas específicos de transporte de péptidos. Por último, una vez dentro de la célula los péptidos se hidrolizan de nuevo por la acción conjunta y coordinada de varias peptidasas hasta formar péptidos aún más pequeños y aminoácidos libres. Sin embargo, estudios genómicos recientes han revelado la existencia de diferencias significativas en los sistemas proteolíticos de las BAL lo que, seguramente, refleja la adaptación de las BAL a los distintos nichos ecológicos colonizados por ellas. Así, la hidrólisis de proteínas lácteas durante su fermentación por BAL y la consiguiente liberación de péptidos bioactivos constituyen una aproximación atractiva para la obtención de alimentos funcionales enriquecidos en péptidos bioactivos, debido a su bajo coste y a su positiva imagen nutricional. Por ello, de gran interés científico y aplicado resulta la identificación y caracterización de BAL que liberen péptidos con actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) o con otras actividades biológicas durante su desarrollo en leche

desnatada de vaca (LDV), la identificación de las proteasas y/o peptidasas responsables de la liberación de péptidos bioactivos por las BAL más activas, y el diseño de BAL o levaduras que actúen como “factorías celulares” de liberación de péptidos con actividad inhibidora de la ECA.

Por consiguiente, los objetivos de este trabajo de investigación han sido los siguientes:

(A). Evaluación, selección y caracterización de BAL de origen alimentario, ambiental y clínico con actividad inhibidora de la ECA (AI-ECA) y detección e identificación de péptidos con actividad inhibidora de la ECA (PI-ECAs) y otros péptidos bioactivos generados durante su desarrollo en leche desnatada de vaca (LDV).

(B). Diseño genético de cepas de *Lactococcus lactis* transformadas con vectores de expresión proteica que permitan la liberación controlada de enterolisina A (EnIA) y la lisis de las cepas productoras. Evaluación de la AI-ECA y detección e identificación de los PI-ECAs y otros péptidos bioactivos generados durante el desarrollo de las cepas recombinantes de *L. lactis* en LDV.

(C). Diseño genético de vectores de expresión proteica que permitan determinar el papel de la gelatinasa (GelE) y serina proteasa (SprE), dos proteasas extracelulares producidas por *Enterococcus faecalis* DBH18, en la producción de hidrolizados lácteos con AI-ECA y en la detección e identificación de PI-ECAs y otros péptidos bioactivos, producidos por cepas de *Enterococcus* spp. transformadas con dichos vectores.

(D). Evaluación de vectores de expresión proteica que codificando la GelE (*gelE*) y SprE (*sprE*) de *E. faecalis* DBH18 y transferidos por transformación a otras BAL de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Streptococcus* permitan la producción de hidrolizados lácteos con AI-ECA y la detección e identificación de PI-ECAs y otros péptidos bioactivos, generados durante su desarrollo en LDV.

(E). Purificación de la GelE a homogeneidad y evaluación de su papel en la producción de hidrolizados lácteos de elevada AI-ECA. Detección e identificación de los PI-ECAs y otros péptidos bioactivos generados durante la hidrólisis de la LDV con GelE.

No obstante, para lograr los objetivos propuestos ha sido necesario desarrollar el siguiente trabajo investigador:

(1). Desarrollo de BAL de origen alimentario, ambiental y clínico en LDV y selección de las cepas productoras de hidrolizados lácteos con elevada AI-ECA.

(2). Determinación de la presencia de factores potenciales de virulencia y de resistencia a antibióticos en cepas de *E. faecalis* de diversos orígenes productoras de hidrolizados lácteos con elevada AI-ECA.

(3). Determinación, mediante Electroforesis en Geles de Campo Pulsante (PFGE) y MLST (del inglés, *Multilocus Sequence Typing*) de la similitud e identidad genética de las cepas de *E. faecalis* de diversos orígenes productoras de hidrolizados lácteos con elevada AI-ECA.

(4). Detección e identificación, mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con columnas cromatográficas de Fase Inversa (RP-HPLC) acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem con Ionización de las muestras por Electrospray (RP-HPLC-MS/MS) de PI-ECAs y otros péptidos bioactivos liberados durante el desarrollo de las cepas de *E. faecalis* de diversos orígenes en LDV.

(5). Clonación de la EnIA, producida por *E. faecalis* DAC9, en un vector de expresión de promotor inducible por la nisina que permita la liberación controlada de la EnIA y la lisis de las cepas de *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* IL1403 y *L. lactis* subesp. *cremoris* NZ9000, transformadas con este vector. Evaluación de la AI-ECA y detección e identificación por RP-HPLC-MS/MS de los PI-ECAs y otros péptidos bioactivos generados durante el desarrollo de las cepas transformadas de *L. lactis* en LDV.

(6). Determinación de la secuencia nucleotídica de los genes que codifican la GelE (*gelE*) y la SprE (*sprE*), producidas por *E. faecalis* DBH18, mediante la amplificación por PCR de su ADN genómico purificado y la secuenciación nucleotídica de los fragmentos amplificados resultantes.

(7). Utilización de vectores de expresión proteica de promotor constitutivo que permitan la clonación, producción y expresión funcional de GelE y SprE de *E. faecalis* DBH18 por cepas no proteolíticas de *Enterococcus* spp. Evaluación de la AI-ECA y detección e identificación por RP-HPLC-MS/MS de los PI-ECAs y otros péptidos bioactivos, generados durante desarrollo de las cepas transformadas de *Enterococcus* spp. en LDV.

(8). Transferencia por transformación a otras BAL de los vectores de expresión proteica que codifican las proteasas extracelulares GelE y SprE de *E. faecalis* DBH18 y determinación de la AI-ECA, de los perfiles peptídicos y de la generación de PI-ECAs y otros péptidos bioactivos, durante el desarrollo de las BAL transformadas en LDV.

(9). Obtención de anticuerpos policlonales de actividad predeterminada frente al péptido antihipertensivo LHLPLP y desarrollo de un ensayo inmunoenzimático competitivo indirecto (ELISA-CI) para la detección y cuantificación del péptido LHLPLP, derivado de la β -caseína bovina, en hidrolizados lácteos con elevada AI-ECA.

(10). Clonación de la secuencia nucleotídica de la GelE sin su péptido señal y de la GelE madura de *E. faecalis* DBH18 en vectores de expresión proteica que permitan la producción heteróloga y expresión funcional de la GelE madura por las levaduras *Pichia pastoris* X-33 y *Kluyveromyces lactis* GG799.

(11). Purificación de la GelE madura mediante diversos pasos de purificación y determinación de su purificación a homogeneidad.

(12). Obtención de hidrolizados lácteos derivados de la hidrólisis enzimática de la LDV con la GeE purificada a homogeneidad. Determinación de la AI-ECA de los hidrolizados lácteos y determinación por Espectrometría de Masas (MS) mediante Desorción/Ionización de la Matriz mediante Láser (MALDI) con acoplamiento a un detector de Tiempo de Vuelo (MALDI-TOF/MS) de la presencia de PI-ECAs y otros péptidos bioactivos. Cuantificación, mediante un ELISA-CI, del péptido antihipertensivo LHLPLP.

During the last years has been suggested that the ingestion and intake of peptides derived from food substrates may have a beneficial impact on human health and that their use by the food industry may improve the quality and safety of the consumed foods. Recent reports have also described the existence of peptides displaying biological activities, the so called bioactive peptides with antimicrobial, antihypertensive, antithrombotic, antihypercholesterolemic, immunomodulatory, antioxidant and other biological activities. The bioactive peptides are encrypted in the primary amino acid sequence of many food proteins and hydrolysis is required for their liberation and activation. Accordingly, bioactive peptides can be released from protein or oligopeptide precursors by: (i) gastrointestinal hydrolysis; (ii) hydrolysis with purified proteolytic enzymes; or (iii) by fermentation of food proteins, mainly milk proteins, by the proteolytic system of lactic acid bacteria (LAB). Among the bioactive peptides those with antihypertensive activity are of great interest due to the importance of hypertension as a risk factor in the development of cardiovascular and renal diseases with a high incidence in most developed countries. The antihypertensive activity of the bioactive peptides can be evaluated *in vitro* by measuring the inhibition of the angiotensin converting enzyme (ACE), a fundamental regulatory enzyme in the renin-angiotensin system (RAS) with a key role in the physiological regulation of the blood pressure, and also *in vivo* by measuring its effect in the reduction of the blood pressure of spontaneously hypertensive rats (SHR).

On the other hand, the food industry faces the increasing demand by consumers of healthier, ready-to-eat, less processed and chemical additives-free food products. Accordingly, the presence in the food market of products enriched with bioactive peptides would permit the use of these products as preventive compounds against pathologies such as the cardiovascular diseases. In this context, LAB which are commonly used in the food industry as starter cultures for production of fermented foods may represent an interesting approach for their use in the production of bioactive peptides derived from food proteins. The LAB strains used as starters possess a complex proteolytic system which, during the fermentation process, hydrolyses and degrades milk proteins, mainly caseins, to release peptides and amino acids that constitute the essential nitrogen source for their growth in these substrates. The hydrolysis of caseins by LAB usually starts with the hydrolysis of these proteins by a cell wall-associated proteinase (CEP) and the subsequent release of a great number of oligopeptides. Then, the resulting oligopeptides are transported inside the cells by specific transport systems. Finally, once inside the cells the peptides are further degraded by the coordinate and joint action of several endopeptidases to produce smaller peptides and free amino acids. However, recent comparative genomic studies involving different LAB have revealed significant differences among their proteolytic systems, which may reflect the adaptation of LAB to a number of ecological niches. Accordingly, the hydrolysis of milk proteins during their fermentation by LAB and the subsequent release of bioactive peptides constitute an attractive approach to the production of functional foods enriched with bioactive peptides, due to its low economic cost and positive nutritional image. Therefore, the identification and characterization of novel LAB strains able to release ACE-inhibitory peptides (ACE-IPs) or peptides with other biological activities during their growth in bovine skim milk (BSM), the identification of proteases and/or peptidases responsible of the production of bioactive peptides by the most active LAB strains, and the design of LAB or yeast strains as “cell factories”

to release ACE-IPs and other bioactive peptides, constitute research activities of a great scientific and applied interest.

Accordingly, the objectives of this research work have been the following:

(A). Evaluation, selection and characterization of LAB from food, environmental and clinical origin producers of milk-derived hydrolysates with high ACE-inhibitory activity (ACE-IA) and detection and identification of ACE-inhibitory peptides (ACE-IPs) and other bioactive peptides during their growth in bovine skim milk (BSM).

(B). Genetic design of *Lactococcus lactis* strains transformed with protein expression vectors to drive the controlled release of enterolysin A (EnlA) and the lysis of the EnlA-producer strains. Evaluation of the ACE-IA and detection and identification of ACE-IPs and other bioactive peptides during growth of the recombinant *Lactococcus lactis* strains in BSM.

(C). Genetic design of protein expression vectors to determine the role of gelatinase (GelE) and serine protease (SprE), two extracellular proteases produced by *Enterococcus faecalis* DBH18, in the production of milk-derived hydrolysates with ACE-IA and detection and identification of ACE-IPs and other bioactive peptides, released by the *Enterococcus* spp. strains transformed with these vectors.

(D). Evaluation of protein expression vectors that encoding the GelE (*gelE*) and SprE (*sprE*) from *E. faecalis* DBH18 and transferred by transformation to LAB from the genera *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Streptococcus* could permit the production of milk-derived hydrolysates and the detection and identification of ACE-IPs and other bioactive peptides during their growth in BSM.

(E). Purification of mature GelE to homogeneity and evaluation of its role in the production of milk-derived hydrolysates with high ACE-IA. Detection and identification of ACE-IPs and other bioactive peptides, generated during the enzymatic hydrolysis of BSM with GelE.

However, to reach the proposed objectives it was necessary to perform the following research work:

(1). Growth of LAB from food, environmental and clinical origin in BSM and selection of the isolates producing milk-derived hydrolysates with high ACE-IA.

(2). Characterization of potential virulence factors and resistance to antibiotics in *E. faecalis* strains from different origin producing milk-derived hydrolysates with high ACE-IA.

(3) Determination by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) and Multilocus Sequence Typing (MLST) techniques of the similarity and genetic identity of *E. faecalis* strains from different origin producing milk-derived hydrolysates with high ACE-IA.

(4). Detection and identification by Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) coupled to Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (RP-HPLC-MS/MS) of the presence of ACE-IPs and other bioactive peptides produced by the *E. faecalis* strains from different origin during their growth in BSM.

(5). Cloning of the gene (*enlA*) encoding the enterolysin A (EnlA), produced by *E. faecalis* DAC9, in a protein expression vector to drive the controlled release of EnlA and the lysis of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 and *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 strains transformed with this vector. Determination of the ACE-IA and detection and identification by RP-HPLC-MS/MS of the presence of ACE-IPs and other bioactive peptides released during growth of the recombinant *L. lactis* strains in BSM.

(6). Determination, from purified genomic DNA and PCR amplification techniques of the nucleotide sequence of genes encoding GelE (*gelE*) and SprE (*sprE*) in *E. faecalis* DBH18.

(7). Use of protein expression vectors for cloning, production and functional expression of the GelE and SprE from *E. faecalis* DBH18 by non-proteolytic *Enterococcus* spp. strains. Evaluation of the ACE-IA and detection and identification by RP-HPLC-MS/MS of the peptide profiles and the presence of ACE-IPs and other bioactive peptides released during growth of the transformed *Enterococcus* spp. strains in BSM.

(8). Incorporation by transformation of protein expression vectors encoding the extracellular proteases GelE and SprE, produced by *E. faecalis* DBH18, to LAB of diverse genera and species and determination of the ACE-IA and identification of the ACE-IPs and other bioactive peptides released during growth of the transformed LAB strains in BSM.

(9). Generation of polyclonal antibodies of predetermined activity for the antihypertensive peptide LHLPLP and development of a competitive-indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA-CI) to detect and quantify the peptide LHLPLP, derived from bovine β -casein, in BSM-derived hydrolysates with high ACE-IA.

(10). Cloning of the nucleotide sequence of the GelE without its signal peptide and that of mature GelE from *E. faecalis* DBH18 in protein expression vectors that could drive the heterologous production and functional expression of mature GelE by the yeasts *Pichia pastoris* X-33 and *Kluyveromyces lactis* GG799.

(11). Purification of the GelE using different purification steps and determination of its purification to homogeneity.

(12). Generation of milk-derived hydrolysates by the enzymatic hydrolysis of BSM with mature GelE purified to homogeneity. Determination of the ACE-IA of the BSM-derived hydrolysates and detection and identification by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) Time-of-Flight (TOF) Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) of the presence of ACE-IPs and other bioactive peptides. Detection and quantification, in the BSM-derived hydrolysates of the antihypertensive peptide LHLPLP by a CI-ELISA.

CAPÍTULO

2

Introducción general

2.1. ALIMENTOS FUNCIONALES

El interés de los responsables de la salud pública y de los consumidores por la relación entre la dieta y la salud ha aumentado considerablemente durante los últimos años. No obstante, aunque el seguimiento de una dieta sana, variada y equilibrada constituye la mejor opción para prevenir enfermedades y preservar la salud, dicho equilibrio no siempre es fácil de mantener. En este sentido, los nuevos estilos de vida han provocado que se abandonen hábitos de alimentación saludables que, durante años, han formado parte de la historia y tradición de culturas como la mediterránea y, en consecuencia, que muchas personas no sigan una alimentación equilibrada. Este hecho, junto con el aumento de la esperanza de vida ligado al incremento de los costes sanitarios y la necesidad de proporcionar una mejora en la calidad de vida de las personas mayores, ha impulsado el desarrollo de los alimentos funcionales que pueden compensar los desequilibrios alimentarios y garantizar las ingestas de nutrientes recomendadas por los especialistas en nutrición (Arai, S., 1996; Roberts y Rosenberg, 2006).

Aunque la conocida declaración de Hipócrates de “que tu alimento sea tu medicina” puede considerarse como la primera referencia a la idea de alimento funcional, el concepto de alimentos funcionales *per se* se establece por primera vez en Japón en 1984. En este país, el incremento de esperanza de vida de la población y el consiguiente aumento del gasto sanitario originaron que el gobierno se plantease la necesidad de desarrollar productos alimenticios que mejorasen la salud de los ciudadanos para, de esta manera, garantizar un mayor bienestar y una mejor calidad de vida. De acuerdo con la legislación japonesa de 1991, los alimentos denominados FOSHU (del inglés *Foods for Specified Health Use*) deben ser autorizados únicamente tras la evaluación de resultados exhaustivos con fundamento científico que apoyen la alegación relativa a las propiedades beneficiosas de los mismos.

Por otra parte, como consecuencia de la necesidad de compensar una alimentación desequilibrada muy rica en grasas saturadas y pobre en grasas insaturadas, minerales, vitaminas y fibra típica de las dietas basadas en alimentos preparados antes de su consumo, el consumo de alimentos funcionales se extendió rápidamente a otros países como EE.UU. y Canadá, así como a los de la Unión Europea (UE). En lo que respecta a esta última, el abordaje científico de los alimentos funcionales comienza en 1995 con el proyecto FUFOS (del inglés *Functional Food Science in Europe*) una Acción Concertada financiada por la Comisión Europea y coordinada por la Sección Europea del International Life Sciences Institute (ILSI). El proyecto FUFOS abarcó seis áreas diferentes de la alimentación y la salud: (i) crecimiento, desarrollo y diferenciación; (ii) metabolismo; (iii) defensa contra especies oxidativas reactivas; (iv) alimentos funcionales y sistema cardiovascular; (v) fisiología y función gastrointestinal; y (vi) la alimentación en el control del comportamiento y las funciones cognitivas. Entre los resultados más relevantes de este proyecto se encuentra la propuesta de una definición *ad hoc* para este tipo de alimentos. Así, en el documento consenso “Conceptos Científicos sobre los Alimentos Funcionales en Europa” dichos alimentos se definen como aquellos que, con independencia de aportar nutrientes, han demostrado científicamente que afectan beneficiosamente a una o varias funciones del organismo de manera que proporcionan un mejor estado de salud y bienestar y/o reducen el riesgo de padecer enfermedades (Diplock y col., 1999). Se establece, además, que

los alimentos funcionales deben consumirse en forma de alimentos (se excluyen por tanto los comprimidos, cápsulas o cualquier otra forma de suplemento alimenticio), ejercer sus efectos beneficiosos en las cantidades en que normalmente se consumen en la dieta y formar parte de una dieta normal. Posteriormente, entre 2001 y 2005 se desarrolló el proyecto PASSCLAIM (acrónimo de Process of the Assessment of Scientific Support for Claims on Foods) también financiado por la Comisión Europea y coordinado por la Sección Europea del ILSI. El objetivo principal de dicho proyecto consistió en la selección de criterios utilizados como base para la fundamentación científica de las alegaciones de los alimentos funcionales relacionadas con la salud, incluyendo la forma de diseñar estudios científicos válidos y la identificación, validación y uso de marcadores para explorar los efectos de la dieta en la salud (Asp y col., 2004).

Considerando tanto las conclusiones de los proyectos FUFOSE y PASSCLAIM como las Directrices del Codex Alimentarius¹, la Unión Europea elaboró el Reglamento (CE) N°1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables de los alimentos con el objetivo de regular las declaraciones (también denominadas alegaciones) efectuadas en el etiquetado, la presentación o la publicidad de los alimentos funcionales. Este Reglamento define las declaraciones como “cualquier mensaje o representación que no sea obligatorio con arreglo a la legislación comunitaria o nacional, incluida cualquier forma de representación pictórica, gráfica o simbólica, que afirme, sugiera o dé a entender que un alimento posee unas características específicas”. Dentro de éstas, las declaraciones nutricionales pueden definirse como aquellas que afirmen, sugieran o impliquen que un alimento posee propiedades nutricionales específicas debido a su aporte energético o contenido en nutrientes u otras sustancias (por ejemplo: “alto contenido en fibra”). Tanto las declaraciones nutricionales autorizadas como las condiciones que se les aplican aparecen recogidas en el Anexo del Reglamento (CE) N° 1924/2006. Por otra parte, las declaraciones de propiedades saludables entendidas como cualquier declaración que afirme, sugiera o dé a entender que existe una relación entre una categoría de alimentos, un alimento o uno de sus constituyentes y la salud, se dividen en dos subgrupos: (i) declaraciones de propiedades saludables distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños (por ejemplo: “la cafeína puede mejorar el desarrollo cognitivo”); y (ii) declaraciones de reducción del riesgo de enfermedad y declaraciones relativas al desarrollo y la salud de los niños (por ejemplo: “una ingesta adecuada de calcio puede ayudar a reducir el riesgo de osteoporosis”). En lo que se refiere al subgrupo (i), recientemente se ha publicado el Reglamento (CE) N°432/2012 de la Comisión, de 16 de mayo de 2012, por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños. Estas declaraciones aparecen asimismo recogidas en un Registro electrónico, accesible a través de la dirección de Internet <http://ec.europa.eu/nuhclaims> en el que también se encuentran las

¹ A nivel internacional, el Codex Alimentarius fue creado en 1963 por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, del inglés *Food and Agriculture Organization*) y la Organización Mundial de la Salud (WHO, del inglés *World Health Organization*) para desarrollar normas alimentarias, reglamentos y otros textos relacionados, así como para la coordinación de todas las normas alimentarias acordadas por las organizaciones gubernamentales y no gubernamentales.

declaraciones autorizadas del subgrupo (ii). Este registro muestra para cada una de las declaraciones autorizadas la redacción propuesta para la misma, las condiciones/restricciones relativas a su uso, la opinión emitida por la EFSA y la legislación específica aplicable.

Por último, conviene señalar que el Reglamento (CE) N°1924/2006 constituye un importante avance en materia de protección de los consumidores dado que establece la necesidad de disponer de evidencias científicas reales de las propiedades saludables declaradas, cuya validez deberá ser contrastada por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority, EFSA) con el fin de que el consumidor reciba una información veraz, fiable y comprensible que le permita seleccionar los diferentes alimentos puestos a su disposición.

2.2. PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS BIOACTIVOS DE ORIGEN LÁCTEO

Entre los componentes de los alimentos funcionales (carotenoides, flavonoides, fibra dietética, fenoles, isoflavonas, ácidos grasos poliinsaturados y otros) uno de los más novedosos y prometedores son los péptidos bioactivos, derivados de proteínas alimentarias. Los péptidos bioactivos son péptidos de pequeño tamaño (3 a 20 aa) que se encuentran encriptados en sus proteínas precursoras y que, una vez liberados por hidrólisis de las mismas, ejercen un gran número de funciones biológicas beneficiosas para la salud humana. En este sentido, las proteínas de la leche se consideran una importante fuente de péptidos bioactivos en comparación con otras fuentes de proteínas alimentarias como la carne, el pescado, el trigo o la soja. Así, además de las actividades biológicas que desempeñan naturalmente las proteínas de la leche los péptidos bioactivos, derivados de las mismas, pueden influir adicionalmente en diferentes sistemas fisiológicos del organismo.

2.2.1. LA LECHE

Según se define en el Codex Alimentarius la leche es la secreción mamaria normal de animales lecheros obtenida mediante uno o más ordeños, sin ningún tipo de adición o extracción y destinados al consumo en forma de leche líquida o a elaboración ulterior (WHO/FAO CODEX STAN 206-1999). La leche es uno de los pilares de la dieta debido a la riqueza y variedad de sus elementos nutritivos y cumple la función de nutrir al neonato, ayudar al establecimiento de sus funciones inmunológicas y endocrinas y de actuar como modulador de las funciones gastrointestinales y la microbiota intestinal, entre otras (Pihlanto-Leppä, 2001; Korhonen y Pihlanto, 2006; Kau y col., 2011). La leche es un producto nutritivo complejo compuesto principalmente por agua, carbohidratos, lípidos, proteínas y otros componentes minoritarios como vitaminas, sales minerales y enzimas en proporciones que varían en función de la especie (Capuco y Akers, 2009) (**Tabla 2.1**).

Tabla 2.1. Composición de la leche (g/100g) de diferentes especies de mamíferos.

Especie	Agua	Lípidos	Proteínas	Lactosa
Caprina	86,7	3,5	3,1	4,6
Ovina	82,0	5,3	5,5	4,6
Bovina	87,3	4,4	3,4	4,8
Humana	87,1	4,5	1,1	6,9

Adaptado de Jensen (1995).

Desde el punto de vista nutricional las proteínas lácteas constituyen una valiosa fuente de aminoácidos esenciales y sustancias biológicamente activas, representando la fracción más compleja de la leche. Estas proteínas se dividen en dos grupos bien diferenciados: las caseínas, que son el principal componente proteico de la leche, y las proteínas del suero (**Tabla 2.2**).

Tabla 2.2. Proteínas de la leche de vaca y algunas de sus propiedades.

Proteína	Cantidad en leche desnatada (g/L)	Variantes genéticas mayoritarias	Peso molecular (Da)	Punto isoelectrico
α_{s1} -CN	12-15	B	23.615	4,44-4,76
		C	23.542	
α_{s2} -CN	3-4	A	25.226	
β -CN	9-11	A1	24.023	
		A2	23.983	4,83-5,07
		B	24.092	
κ -CN	2-4	A	19.037	5,45-5,77
		B	19.006	5,3-5,8
β -Lg	2-4	A	18.363	5,13
		B	18.277	5,13
α -La	0,6-1,7	B	14.178	4,2-4,5
BSA	0,4	A	66.399	4,7-4,9
IgG1	0,3-0,6		161.000	5,5-6,8
IgG2	0,05		150.000	7,5-8,3
IgA	0,01		385.000-417.000	
IgM	0,09		1.000.000	
LF	0,02-0,1		76.110	8,81

CN: caseína; Lg: lactoglobulina; La: lactoalbúmina; BSA: seroalbúmina bovina; Ig: inmunoglobulina; LF: lactoferrina. Adaptado de Farrell y col. (2004).

2.2.1.1. Caseínas

Las caseínas bovinas, que constituyen el 80% de las proteínas de la leche de vaca, se definen como fosfoproteínas que precipitan de la leche cruda de vaca cuando ésta se acidifica hasta pH 4,6 a 20 °C (Jenness y col., 1956). Bajo la denominación de caseínas se incluyen 4 familias: α_{s1} -caseína (α_{s1} -CN), α_{s2} -caseína (α_{s2} -CN), β -caseína (β -CN) y κ -caseína (κ -CN) (Farrell y col., 2004). Las caseínas son proteínas complejas y muy diferentes a otras proteínas, debido al alto contenido de prolina (P) y a las regiones ácidas que incluyen los residuos de fosfoserina. Asimismo, la estructura secundaria de las caseínas está poco organizada y es similar a la de las proteínas globulares desnaturalizadas (Walstra y Jenness, 1984). Por su diferente distribución de cargas e hidrofobicidad las caseínas se unen entre sí y se asocian a sales inorgánicas, principalmente calcio y fosfato, para formar unas unidades o agregados coloidales llamados micelas, que proporcionan a la leche su opalescencia característica (Qi, 2007) (**Fig. 2.1**).

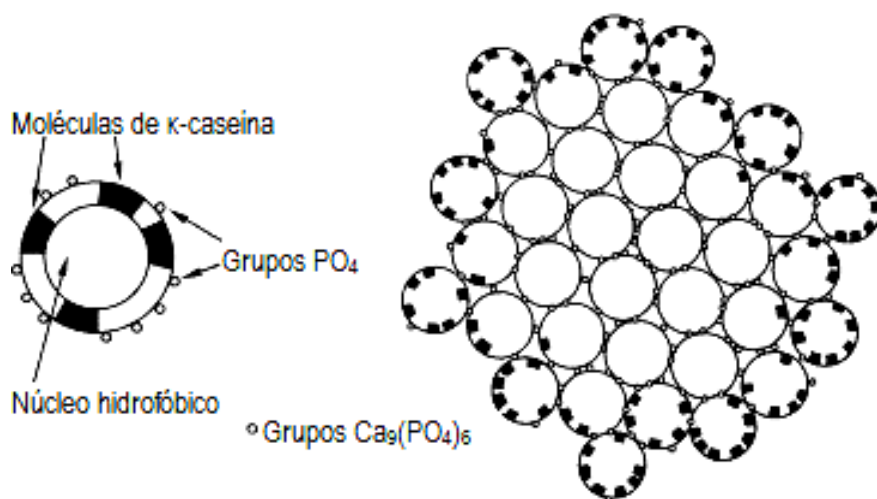


Fig. 2.1. Esquema de la estructura micelar de las caseínas bovinas. Adaptado de Farrell y col. (2006).

2.2.1.2. Proteínas del suero

El término proteínas del suero o proteínas solubles engloba a un conjunto de proteínas que permanecen en la fase líquida tras la precipitación de las caseínas a pH 4,6 y 20 °C (Whitney, 1988). Aunque la concentración de las proteínas del suero difiere de unas especies a otras, en la leche de vaca se encuentran en la proporción de unos 6 g/L. Tradicionalmente se han considerado proteínas séricas mayoritarias la β -lactoglobulina (β -Lg), la α -lactoalbúmina (α -La), la seroalbúmina (BSA), las inmunoglobulinas (Ig) y la fracción proteosa-peptosa (Farrell y col. 2004). Las proteínas séricas minoritarias incluyen la lactoferrina (LF), el caseinomacropéptido que se libera de la κ -CN en la primera etapa de la producción del queso y enzimas como la plasmina y lactoperoxidasa (Walstra y Jenness, 1984). Las proteínas séricas, a diferencia de las

caseínas, manifiestan una estructura terciaria globular y compacta estabilizada por puentes disulfuro entre cisteínas, lo que las convierte en menos susceptibles a su hidrólisis.

2.2.2. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LOS PÉPTIDOS LÁCTEOS

Además de poseer un elevado valor nutricional la fracción proteica de la leche es precursora de numerosos péptidos biológicamente activos y de otros de actividad todavía desconocida. En las últimas décadas el estudio y caracterización de los péptidos bioactivos, derivados de las proteínas de la leche ha cobrado una enorme importancia debido a su posible utilidad biotecnológica, tanto por la industria alimentaria como en el ámbito de la salud. Los péptidos bioactivos poseen actividad biológica tras su liberación, mediante hidrólisis, de las proteínas en las que se encuentran encriptados (Meisel, 1998). Dichos péptidos bioactivos pueden ser liberados por la acción de: (i) enzimas proteolíticas digestivas; (ii) el sistema enzimático proteolítico de microorganismos, especialmente de las bacterias productoras de ácido láctico, bacterias acidolácticas o bacterias lácticas (BAL); y (iii) por enzimas proteolíticas purificadas de microorganismos, animales o plantas (Korhonen y Pihlanto, 2006).

La evaluación de la funcionalidad biológica de péptidos derivados de la hidrólisis de proteínas lácteas han sido objeto de numerosos estudios (Gobbetti y col., 2002; Meisel, 2004; FitzGerald y Murray, 2006; Korhonen y Pihlanto, 2006; Hernández Ledesma y col., 2011; Mills y col., 2011; Phelan y Kerins., 2011) lo que refleja el interés que los péptidos bioactivos suscitan en el ámbito científico, biotecnológico e industrial. La relevancia de los péptidos bioactivos responde, fundamentalmente, a la variedad de actividades biológicas que ejercen en distintos sistemas fisiológicos (Fig. 2.2).

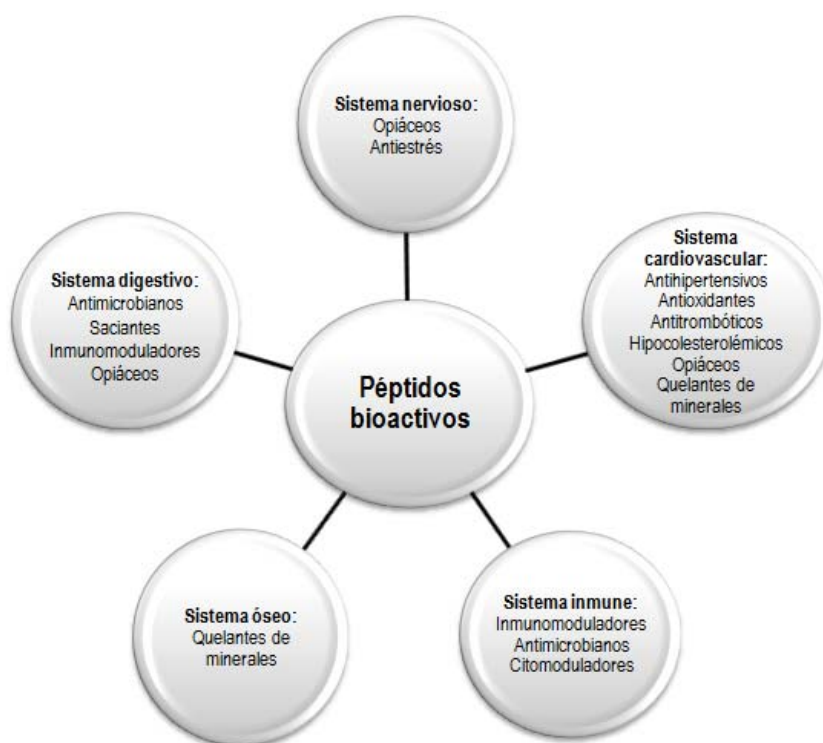


Fig. 2.2. Características biológicas de los péptidos bioactivos derivados de proteínas lácteas.

La actividad funcional mejor evaluada asociada a los péptidos bioactivos, derivados de proteínas lácteas, es la relacionada con el control de la hipertensión arterial (López-Fandiño y col., 2006; Saito, 2008; Martínez-Maqueda y col., 2012). Esta patología es la responsable directa de 7,5 millones de muertes al año en el mundo lo que representa un 12,5% del total de fallecimientos (WHO, del inglés *World Health Organization*, 2010). Además, la hipertensión arterial es el factor de riesgo cardiovascular prevalente en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares, las cuales constituyen la primera causa de morbilidad en el mundo (Ezzati y col., 2002). Según la WHO, el 27% de la población mundial padece hipertensión arterial. En España, esta cifra se sitúa en el 23% de la población adulta mayor de 25 años, alcanzando el 65-75% en personas de más de 60 años. Estas cifras tan elevadas, similares a las de otros países con el mismo nivel de desarrollo que España y responsables de un importante coste socioeconómico, se explican por el envejecimiento de la población, la mayor supervivencia de personas afectadas por patologías cardiovasculares y por el incremento de otros factores de riesgo como la obesidad. Por lo tanto, cualquier componente de la dieta que reduzca la presión sanguínea elevada es un candidato potencial para su evaluación en la reducción del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares

2.3. LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL

La presión arterial se define como la fuerza ejercida por la sangre que circula por las arterias cuando el corazón la bombea para su distribución por todo el cuerpo. La presión arterial está determinada por la fuerza y el volumen de sangre bombeada, así como por el tamaño y la flexibilidad de las arterias, y cambia continuamente dependiendo de la actividad, la temperatura, la dieta, el estado emocional, la postura, el estado físico y los medicamentos administrados (Medical Encyclopedia, <http://www.umm.edu/ency/>). La definición de hipertensión arterial (HTA) está consensuada, es decir, se establece mediante el acuerdo de expertos que han situado los niveles normales de presión arterial sistólica (PAS) en valores inferiores a 140 mmHg y de presión arterial diastólica (PAD) por debajo de 90 mmHg. Por lo tanto, la HTA consistiría en la elevación crónica de la PAS o PAD por encima de los valores normales (**Tabla 2.3**).

El tratamiento de la HTA se basa en la combinación de una terapia farmacológica adecuada y el seguimiento de medidas relacionadas con los hábitos de vida saludable como el abandono del tabaco, la reducción del peso en caso de sobrepeso, la moderación del consumo de alcohol, la realización de actividad física, la reducción del aporte de sal de la dieta y, en general, el seguimiento de unos hábitos de alimentación saludables (Dickinson y col., 2006).

Tabla 2.3. Definiciones y clasificaciones de las cifras de presión arterial (PA) (mmHg).

Categoría ^a	PAS		PAD
Óptima	< 120	y	< 80
Normal	120-129	y/o	80-84
En el límite de la normalidad	130-139	y/o	85-89
Hipertensión arterial de grado 1	140-159	y/o	90-99
Hipertensión arterial de grado 2	160-179	y/o	100-109
Hipertensión arterial de grado 3	≥ 180	y/o	≥ 110
Hipertensión sistólica aislada	≥ 140	y	< 90

^a Los grados 1, 2 y 3 corresponden a la clasificación de la hipertensión arterial en leve, moderada y grave, respectivamente. Adaptado de Mancia y col. (2007).

2.3.1. VÍAS METABÓLICAS ASOCIADAS CON EL CONTROL DE LA PRESIÓN ARTERIAL

La presión arterial viene determinada por una serie de factores como el flujo sanguíneo, la resistencia vascular y la concentración de electrolitos, cuyo equilibrio resulta clave para su control, de manera que modificaciones de estos parámetros originan alteraciones de la HTA. En el control de la presión arterial participan mecanismos renales, endocrinos, neurogénicos, cardiogénicos, cardíacos y vasculares así como diversas vías metabólicas interconectadas entre sí. Aunque, tradicionalmente, el control de la presión arterial se ha asociado con el sistema renina-angiotensina (SRA) existen otros sistemas como el de la cinina-óxido nítrico, el de la enzima convertidora de la endotelina o el de la endopeptidasa neutra, que generan péptidos vasorreguladores y natriuréticos que, en su conjunto, modulan la presión arterial y el equilibrio osmótico y de transporte de fluidos (**Fig. 2.3**).

2.3.1.1. El sistema cinina-óxido nítrico

En el sistema cinina-óxido nítrico (**Fig. 2.3**), la calidina derivada del cininógeno por la acción de la calicreína (EC 3.4.21.34) actúa como un potente vasodilatador. A su vez, la hidrólisis de la calidina por la calicreína conduce a la formación de otros péptidos vasodilatadores como la bradiquinina (Unger, 2002). Igualmente, la bradiquinina interviene en la respuesta vasodilatadora uniéndose a los receptores beta (β) lo que origina un aumento de los niveles intracelulares de Ca^{2+} y, como consecuencia, la estimulación de la producción de óxido nítrico mediada por la enzima óxido nítrico sintasa (EC 1.14.13.39) (Schrör, 1992). Esta vía vasodilatadora se inhibe por acción de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA, EC 3.4.15.1) que degrada la bradiquinina.

2.3.1.2. El sistema de la endopeptidasa neutra y la enzima convertidora de la endotelina

La endopeptidasa neutra (EN, EC 3.4.24.11) también conocida como nefrilisina, es una zinc-metaloendopeptidasa presente en numerosos tejidos y que hidroliza la bradiquinina generando

fragmentos inactivos (Turner y col., 2001). Asimismo, la EN hidroliza la angiotensina I y II lo que resulta en la liberación del hexapéptido vasodilatador angiotensina (1-7) (**Fig. 2.3**).

Por otra parte, en respuesta a la estimulación por la angiotensina II y/o al daño endotelial la enzima convertidora de la endotelina (EC 3.4.24.71), también una zinc metaloendopeptidasa, produce el potente vasoconstrictor endotelina I a partir de la proendotelina (FitzGerald y col., 2004; Kohan y col., 2011). A su vez, la liberación de la endotelina I puede ser inhibida por la producción de óxido nítrico en la superficie del endotelio vascular (**Fig. 2.3**).

2.3.1.3. Péptidos natriuréticos

Los péptidos natriuréticos (PNs) se sintetizan y almacenan, principalmente, en los miocitos auriculares y ventriculares. Por ello, constituyen un grupo de péptidos con propiedades vasodilatadoras y protectoras de los tejidos que participan en la regulación de determinadas funciones renales, humorales y cardiovasculares (Savoia y col., 2010) y que son degradados por la EN, principalmente, en el hígado. Estos péptidos ejercen sus efectos biológicos mediante su unión a receptores específicos en las superficies celulares endoteliales, epiteliales y de las células vasculares musculares lisas. Los PNs inhiben a la renina, estimulan la acumulación de GMPc e intervienen, con este compuesto y con el óxido nítrico, en la vasodilatación por relajación del músculo liso.

2.3.1.4. Sistema renina-angiotensina (SRA)

El sistema renina-angiotensina (SRA) es uno de los mayores reguladores de la presión arterial y de control del sistema cardiovascular (Lavoie y Sigmund, 2003). El sistema comprende una cascada de reacciones enzimáticas que tiene como resultado la formación de angiotensina II, un potente vasoconstrictor, que se genera en dos pasos consecutivos: en primer lugar, la renina cataliza la formación de angiotensina I a partir de su precursor, el angiotensinógeno y, posteriormente, la angiotensina I es hidrolizada por la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) para liberar angiotensina II. El angiotensinógeno es el único precursor conocido de la angiotensina, así como el único sustrato conocido para la renina (EC 3.4.23.15). La renina, a su vez, se forma a partir de la prerenina por acción de la calicreína (**Fig. 2.3**).

Asimismo, como resultado de la degradación de la angiotensina I y II se han identificado la angiotensina 1-7, la angiotensina III y la angiotensina IV. Como ya se ha mencionado previamente (sección 2.3.1.2), la angiotensina 1-7 posee efectos diuréticos y vasodilatadores que potencian las acciones de la bradiquinina. Por otra parte, la degradación de la angiotensina II por las aminopeptidasas A y N conduce, respectivamente, a la formación de la angiotensina III, un heptapéptido con el 50 % de la actividad vasoconstrictora de la angiotensina II y del hexapéptido angiotensina IV, que también exhibe actividad vasoconstrictora.

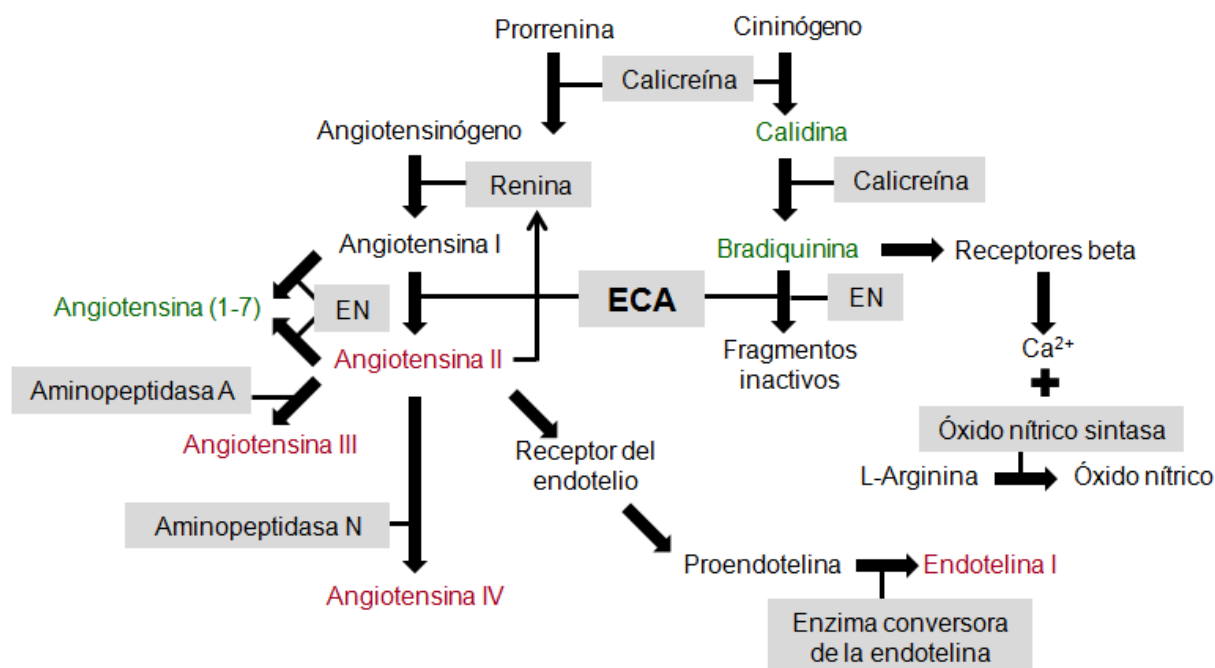


Fig. 2.3. Rutas metabólicas implicadas en la regulación de la presión arterial. Los compuestos con función vasodilatadora y vasoconstrictora se indican con los colores verde y rojo, respectivamente.

2.3.2. INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE LA ANGIOTENSINA (ECA)

La ECA es una peptidil-dipeptidasa que en el sistema renina-angiotensina (SRA) actúa hidrolizando la angiotensina I, un decapeptido inactivo de secuencia DNVYIHPFHL, para liberar la angiotensina II y el dipéptido C-terminal HL (Skeggs y col., 1956). La angiotensina II es un compuesto de elevada potencia vasoconstrictora cuya actividad se encuentra mediada por receptores altamente específicos, los receptores de la angiotensina II tipo 1 (Unger, 2002). Por otra parte, la ECA cataliza la degradación de la bradiquinina un potente vasodilatador y estimula la liberación de aldosterona de la corteza adrenal, lo que regula el equilibrio electrolítico de sodio y agua (Sureshkumar, 2008). En consecuencia, la ECA juega un papel fundamental en la regulación de la presión arterial.

Por tanto, la inhibición de la ECA origina un efecto hipotensor al reducir la producción de angiotensina II e incrementar los niveles de bradiquinina. Aunque se han identificado péptidos endógenos que actúan como inhibidores y sustratos competitivos de la ECA como la mencionada bradiquinina, existen también inhibidores exógenos de la ECA. Los primeros péptidos exógenos inhibidores de la ECA, tanto *in vitro* como *in vivo* se identificaron del veneno de la serpiente *Bothrops jararaca* (Ferreira y col., 1970). Actualmente, un derivado sintético, el Captopril (D-3-mercapto-2-metilpropanoil-1-prolina) deducido del estudio del modelo de acción

hipotético del sitio activo de la enzima, es el fármaco más empleado en el control de la hipertensión arterial (Jarrot y col., 1982; Wyvratt y Pratchett, 1985). Sin embargo, como consecuencia de la administración de inhibidores sintéticos de la ECA en el organismo animal y humano pueden aparecer efectos secundarios adversos como hipotensión, hiperpotasemia, reducción de la función renal o angioedema (Brown y Vaughan, 1998). Por ello, la identificación de compuestos inhibidores de la ECA naturales, eficaces y sin efectos secundarios en el organismo animal y humano resulta de gran interés científico. Actualmente ya se conoce la identidad de péptidos inhibidores de la ECA encriptados en la secuencia aminoacídica de proteínas alimentarias de origen animal (Ryan y col., 2011; Wijesekara y Kim, 2011), de proteínas vegetales (Guang y Phillips, 2009), de proteínas del huevo (Miguel y Aleixandre, 2006; Aleixandre y col. 2008) o de proteínas de la leche de diversas especies animales (López-Fandiño y col., 2006; Jauhiainen y Korpela, 2007; Saito, 2008).

2.3.2.1. Ensayos de inhibición de la ECA *in vitro*

Para determinar la actividad inhibidora de la ECA *in vitro* se han descrito diversos métodos experimentales que podrían utilizarse como métodos de cribado o tamizado para la selección e identificación de péptidos que, posteriormente, podrían evaluarse por su actividad antihipertensiva *in vivo*. Uno de los métodos experimentales desarrollados se basa en la hidrólisis del compuesto Hipuril-Histidil-Leucina (HHL) por la ECA, lo que origina ácido hipúrico y el dipéptido histidil-leucina como productos de la reacción (**Fig. 2.4A**). Igualmente, los productos de la reacción pueden detectarse y cuantificarse por métodos colorimétricos (Chang y col., 2001), fluorimétricos (Schwager y col., 2006), electroforesis capilar (Shihabi, 1999; Chang y col., 2001) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Shalaby y col., 2006). Como se ha citado previamente, uno de los métodos más empleados para determinar la actividad inhibidora de la ECA es el desarrollado por Cushman y Cheung (1971) consistente en la determinación espectrofotométrica a 228 nm del ácido hipúrico formado tras la incubación del compuesto sintético HHL con la ECA, en presencia de las muestras con péptidos potencialmente inhibidores. El método consta de varias etapas que incluyen la extracción del ácido hipúrico, la evaporación del acetato de etilo y la adición de agua antes de la medida de la absorbancia del ácido hipúrico. No obstante, recientemente se han desarrollado otros procedimientos derivados del anterior que no requieren una etapa de extracción previa del ácido hipúrico y que, por lo tanto, facilitan su determinación (Li y col., 2005).

También se han desarrollado otros compuestos sintéticos hidrolizables por la ECA como, por ejemplo, el o-aminobenzoil-glicil-p-nitrofenilalanil-prolina (Carmel y Yaron, 1978), cuya hidrólisis por la ECA libera el compuesto fluorescente o-aminobenzoil-glicina (**Fig. 2.4B**). En este contexto, el método de inhibición de la ECA desarrollado por Sentandreu y Toldrá (2006) y basado en la reacción previamente descrita, permite determinar y cuantificar la actividad inhibidora de la ECA (AI-ECA) de los péptidos evaluados en placas multipocillo mediante el empleo de un fluorímetro. El método es sencillo, no requiere una etapa previa de extracción del producto de la reacción y permite determinar la AI-ECA de un gran número de hidrolizados lácteos en muy poco tiempo.

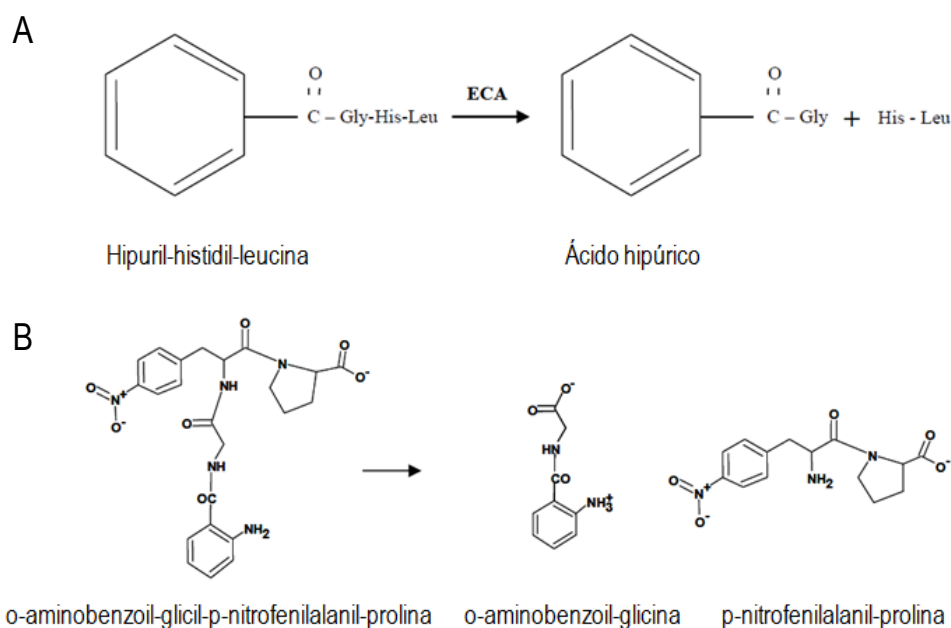


Fig. 2.4. Reacciones catalizadas por la ECA en los sustratos HHL (A) y o-aminobenzoil-glicil-p-nitrofenilalanil-prolina (B). Fuente: Cushman y Cheung (1972) y Carmel y Yaron (1978).

La determinación de la actividad inhibidora de la ECA mediante un ensayo *in vitro* puede expresarse como el porcentaje de inhibición de la ECA ejercido por un determinado compuesto respecto a un control sin inhibidor. Sin embargo, para expresar mejor la actividad inhibidora de la ECA de cualquier compuesto es conveniente determinar el parámetro IC_{50} , que representa la concentración de compuesto para inhibir la actividad de la ECA en un 50%. Así, un valor de IC_{50} bajo se traduce en una potente actividad inhibidora de la ECA (AI-ECA) y, por lo tanto, en una concentración relativamente pequeña de la sustancia inhibidora para reducir la actividad de la ECA. No obstante, se conoce que el método empleado para determinar la AI-ECA puede influir en el valor IC_{50} resultante debido al empleo de diferentes sustratos o de enzimas (ECA) de distinta actividad o distintos orígenes (Vermeirssen y col., 2002; Murray y col., 2004; López-Fandiño y col., 2006). En este sentido, se conoce que el valor IC_{50} del Captopril puede variar entre 0,75 y 22 nM dependiendo del método de análisis utilizado para su determinación (Vermeirssen y col., 2002).

2.3.2.2. Determinación de la actividad antihipertensiva *in vivo* de los péptidos inhibidores de la ECA *in vitro*

La actividad antihipertensiva *in vivo* de los péptidos inhibidores de la ECA *in vitro* se evalúa habitualmente mediante la administración oral del péptido a evaluar en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) (López-Fandiño y col., 2006). En este sentido, se ha observado que la actividad inhibidora de la ECA *in vitro* no siempre se corresponde con efectos antihipertensivos *in vivo* (Abubakar y col., 1998). Por el contrario, algunos péptidos ejercen efectos antihipertensivos *in vivo* a pesar de mostrar una baja actividad inhibidora de la ECA *in vitro*, lo que podría deberse a la formación de productos activos durante su tránsito por el tracto gastrointestinal o por su participación en mecanismos antihipertensivos diferentes de la inhibición de la ECA. Así por

ejemplo, el péptido MAIPPKK derivado de la κ -CN bovina manifiesta actividad antihipertensiva tras su administración oral en SHR a pesar de su elevada IC_{50} (Manso y López-Fandiño, 2003; Miguel y col., 2007). Igualmente, el péptido KVLVPVQ derivado de la β -CN bovina por hidrólisis con una proteinasa de *Lactobacillus helveticus* CP790 manifiesta una potente actividad antihipertensiva *in vivo* a pesar de su baja actividad inhibidora de la ECA *in vitro* (Maeno y col., 1996). Por otra parte, la observación de que el péptido KVLVPV, obtenido por digestión del KVLVPVQ con la enzima pancreática carboxipeptidasa A, manifiesta no solo una potente actividad antihipertensiva *in vivo* sino una elevada AI-ECA *in vitro* sugiere que el péptido KVLVPVQ es el precursor de la forma activa del péptido antihipertensivo KVLVPV (Maeno y col., 1996).

2.3.2.3. Relación estructura/actividad de los péptidos inhibidores de la ECA

Se sabe que la ECA posee dos dominios catalíticos activos independientes, N-terminal y C-terminal, caracterizados por la secuencia consenso HEMGH que resulta crucial para la actividad de la enzima al posibilitar su unión a un átomo de zinc (Wei y col., 1991). Diversos estudios encaminados a determinar el modo de acción de los péptidos inhibidores de la ECA pusieron de manifiesto que la presencia de residuos hidrofóbicos en cualquiera de las tres últimas posiciones de su extremo carboxilo terminal favorece la unión del péptido inhibidor al centro activo de la ECA (Cushman y col., 1973; Ondetti y Cushman, 1982). Los estudios de inhibición realizados con di- y tri-péptidos permitieron determinar que la presencia de triptófano (W), tirosina (Y), fenilalanina (F) o prolina (P) en los péptidos evaluados favorecía la unión del péptido inhibidor a la ECA, especialmente, si el péptido contiene P como último o antepenúltimo residuo, aunque la interacción era menor si este aminoácido ocupaba la penúltima posición (Cheung y col., 1980). Sin embargo, otros estudios han demostrado que la actividad inhibidora de los péptidos también se favorece por la presencia de residuos de lisina (K) o arginina (R), cargados positivamente, en su extremo C-terminal (López-Fandiño y col., 2006). Asimismo, algunos investigadores han sugerido que la combinación de dos residuos hidrofóbicos, como P y W, con un residuo cargado negativamente como E (ácido glutámico) podría propiciar una orientación adecuada del péptido en el sitio activo de la ECA, favoreciendo la interacción del residuo E con el átomo de Zn^{2+} , de forma similar a la interacción del fármaco Lisinopril con la ECA (Li y col., 2004; Otte y col. 2007a). Por otra parte, el desarrollo de modelos de relación estructura-actividad cuantitativos (QSAR, del inglés *Quantitative Structure-Activity Relationship*) para péptidos de hasta 6 aminoácidos derivados de proteínas lácteas ha permitido determinar que: (i) existe una relación positiva entre la actividad inhibidora de la ECA y la presencia de un aminoácido hidrofóbico cargado positivamente en la última posición de su secuencia C-terminal; (ii) no existe relación aparente entre la actividad inhibidora de la ECA y la secuencia del extremo N-terminal; y (iii) péptidos que poseen tripéptidos C-terminales idénticos pueden manifestar actividades inhibidoras diferentes dependiendo del aminoácido adyacente al tripéptido C-terminal (Pripp y col., 2004; Wu y col., 2006).

En general, los fármacos inhibidores de la ECA son compuestos de bajo peso molecular que contienen un grupo quelante de metales como fosfinato, tiol o carboxilato responsable de su unión al átomo de Zn^{2+} presente en el sitio activo de la ECA, y que interaccionan con las

subunidades S1, S1' y S2' de la enzima con una elevada afinidad ($IC_{50} = 0,4\text{--}23\text{ nM}$) (Turk, 2006) (**Fig. 2.5**). Igualmente, los péptidos inhibidores de la ECA derivados de proteínas alimentarias son de pequeño tamaño molecular (entre 2 y 12 aminoácidos) aunque se han descrito péptidos activos con un tamaño de hasta 27 aa (López-Fandiño y col., 2006; Quirós y col., 2007). Por otra parte, la configuración adoptada por el péptido en función de las condiciones de reacción y su estructura final también pueden ser determinantes en su actividad inhibidora de la ECA. Así, el cambio de forma trans a forma cis de una P en posición C-terminal del péptido DKIHP [β -CN f(47-51)] con actividad inhibidora de la ECA originó cambios significativos en su interacción con la ECA (Gómez-Ruiz y col., 2004). También conviene destacar que el mecanismo de inhibición de la ECA podría también implicar, ocasionalmente, la interacción del péptido inhibidor con subunidades diferentes al sitio catalítico de la enzima (Meisel, 1997; Pina y Roque, 2009).

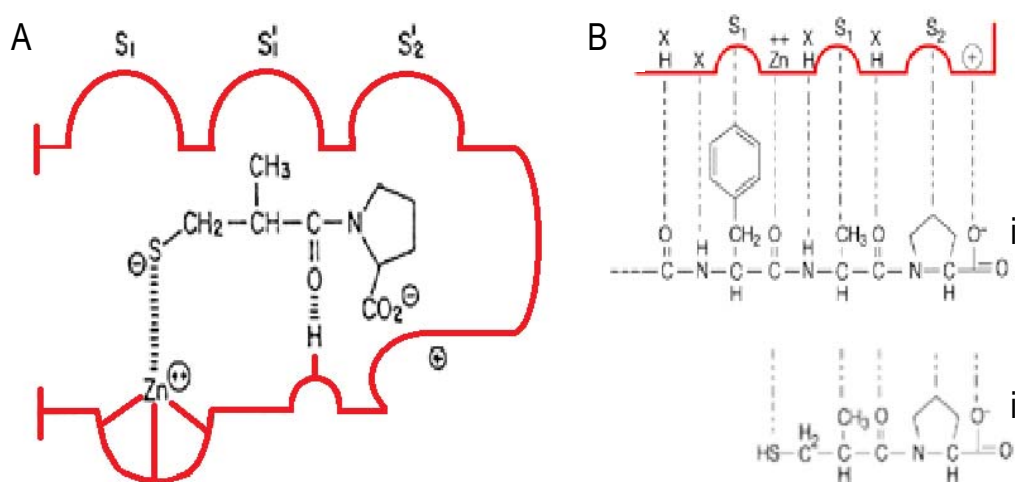


Fig. 2.5. (A) Modelo de interacción del centro activo de la ECA (en rojo) con el fármaco inhibidor Captopril. (B) Unión de un péptido inhibidor de la ECA análogo a los identificados en el veneno de serpiente (i) y del Captopril (ii) al hipotético centro activo de la ECA (en rojo). Adaptado de Lewis y García (2003).

2.4. OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS LÁCTEOS CON ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA ECA (AL-ECA) Y/O ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA

La obtención de péptidos inhibidores de la ECA a partir de proteínas lácteas se consigue mediante la hidrólisis de dichas proteínas con: (i) enzimas proteolíticas digestivas o enzimas proteolíticas purificadas de microorganismos, animales o plantas; (ii) el sistema enzimático proteolítico de microorganismos especialmente de las bacterias productoras de ácido láctico, bacterias acidolácticas o bacterias lácticas (BAL) durante su desarrollo en los sustratos lácteos; o (iii) el uso combinado de ambos procesos. Asimismo, en caso de que se conozca su secuencia

aminoacídica también es posible obtener el péptido inhibidor de la ECA de interés mediante su síntesis química o mediante la tecnología del ADN recombinante.

2.4.1. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

La obtención de péptidos inhibidores de la ECA por hidrólisis enzimática de las proteínas lácteas se ha realizado empleando leche entera o desnatada, preparados de caseínas totales o caseínas individuales, preparados de proteínas del suero (incluyendo concentrados), aislados de proteínas y proteínas individuales o fracciones enriquecidas con las mismas (López-Fandiño y col., 2006; Hernández-Ledesma y col., 2011). Para su hidrólisis se han empleado enzimas de origen animal (pepsina, tripsina y quimotripsina), vegetal (papaína y bromelaína) y microbiano (proteínasa K y proteasas asociadas a la pared celular de las BAL, entre otras) (Pihlanto-Leppälä y col., 2000; FitzGerald y col., 2004; Corrêa y col., 2011). La actividad inhibidora de la ECA de un hidrolizado lácteo depende del número y secuencia aminoacídica de los fragmentos peptídicos generados lo que, a su vez, está determinado por la especificidad de la enzima y las condiciones de procesamiento (relación enzima/sustrato, pH, tiempo y temperatura de hidrólisis) empleadas (van der Ven y col., 2002; Otte y col., 2007b).

La producción de péptidos bioactivos por hidrólisis enzimática de las proteínas lácteas presenta algunas ventajas como la reducción de los costes de producción con respecto a los procesos de fermentación, buena reproducibilidad y un adecuado control del proceso con la posibilidad de incorporar el hidrolizado resultante a una gran variedad de alimentos. En este sentido, durante las últimas dos décadas un gran número de estudios han evaluado la producción de péptidos inhibidores de la ECA y/o de péptidos antihipertensivos a partir de hidrolizados enzimáticos de proteínas lácteas (**Tabla 2.4**).

2.4.1.1. Hidrolizados de caseínas

La estructura abierta y flexible de las caseínas con α -hélices y β -láminas plegadas de corta longitud facilita la actividad hidrolítica de las enzimas proteolíticas. La hidrólisis de estas proteínas con enzimas digestivas, vegetales o microbianas constituye una de las principales estrategias de obtención de péptidos bioactivos, habiéndose determinado que la hidrólisis de las caseínas origina péptidos biológicamente más activos que los de las proteínas del suero (Otte y col., 2007b). También se sabe que la potente actividad inhibidora de la ECA de los péptidos derivados de la hidrólisis de caseínas se debe a su elevado contenido en prolina (Otte y col., 2007b).

Tabla 2.4. Actividad inhibidora de la ECA y actividad antihipertensiva en SHR de péptidos derivados de proteínas lácteas mediante procesos de hidrólisis enzimática.

Fragmento peptídico ^c	Secuencia	IC ₅₀ (μM) ^a	Máximo descenso de la PAS (mm Hg) ^b	Enzima empleada/fuente	Referencia
α _{s1} -CN f(23-34)	FFVAFPPGVFGK	77,0	-34,0	Tripsina	Karaki y col. (1990)
α _{s1} -CN f(90-94)	RYLG Y	0,7	-25,0	Pepsina	Contreras y col. (2009)
α _{s1} -CN f(104-109)	YKVPQL	22,0	-13,0	Proteinasa de <i>Lb. helveticus</i> CP790	Maeno y col. (1996)
α _{s1} -CN f(143-149)	AYFYPEL	6,6	≈-21,0	Pepsina	Contreras y col. (2009)
α _{s1} -CN f(194-199)	TTMPLW	16,0	-13,6	Tripsina	Karaki y col. (1990)
α _{s2} -CN f(89-95)	YQKFPQY	20,1	≈ -15,0	Pepsina	Contreras y col. (2009)
α _{s2} -CN f(189-192)	AMPKPW	580,0	-4,6	Proteinasa de <i>Lb. helveticus</i> CP790	Maeno y col. (1996)
α _{s2} -CN f(190-197)	MKPWIQPK	300,0	-2,9	Proteinasa de <i>Lb. helveticus</i> CP790	Maeno y col. (1996)
α _{s2} -CN f(198-202)	TKVIP	400,0	-9,2	Proteinasa de <i>Lb. helveticus</i> CP790	Maeno y col. (1996)
α _{s2} -CN f(203-208)	PYVRYL	1,9	-23,4	Pepsina	Recio y col. (2005)
β-CN f(59-61)	VYP	288,0	-21,0	Proteinasa K	Abubakar y col. (1998)
β-CN f(59-64)	YVPFG	221,0	-22,0	Proteinasa K	Abubakar y col. (1998)
β-CN f(80-90)	TPVWPPFLQP	749,0	-8,0	Proteinasa K	Abubakar y col. (1998)
β-CN f(140-143)	LQSW	500,0	-2,0	Proteinasa de <i>Lb. helveticus</i> CP790	Maeno y col. (1996)
β-CN f(169-174)	KVLPVP	5,0	-32,2	Proteinasa de <i>Lb. helveticus</i> CP790	Maeno y col. (1996)
β-CN f(169-165)	KVLPVPQ	1000,0	-31,5	Proteinasa de <i>Lb. helveticus</i> CP790	Maeno y col. (1996)
β-CN f(177-183)	AVPYPQR	15,0	-10,0	Tripsina	Karaki y col. (1990)
κ-CN f(22-24) ^d	IAK	15,7	-20,7	Hidrólisis con enzimas digestivas	Gómez-Ruiz y col. (2007); Miquel y col. (2010)
κ-CN f(61-66) ^d	YAKPVA	14,3	-23,1	Hidrólisis con enzimas digestivas	Gómez-Ruiz y col. (2007); Miquel y col. (2010)
κ-CN f(76-86) ^d	WQVLPNAVPAK	10,1	-18,4	Hidrólisis con enzimas digestivas	Gómez-Ruiz y col. (2007); Miquel y col. (2010)
κ-CN f(98-105) ^d	HPHPHLSF	28,9	-15,7	Hidrólisis con enzimas digestivas	Gómez-Ruiz y col. (2007); Miquel y col. (2010)
κ-CN f(106-112)	MAIPPKK	4785,0	≈ -28,0	Tripsina	Manso y López Fandiño (2003); Miquel y col. (2007)
α-La f(50-53)	YGLF	733,0	-23,0	Hidrólisis con enzimas gástricas y pancreáticas	Nurminen y col. (2000)
β-La f(58-61) ^e	LQKW	34,7	-18,1	Termolisina	Hernández-Ledesma y col. (2007)
β-La f(78-80)	IPA	141,0	-31,0	Proteinasa K	Abubakar y col. (1998)
β-La f(103-105)	LLF	79,8	≈ -20,0	Termolisina	Hernández-Ledesma y col. (2007)
β-La f(142-145)	ALPM	928,0	-21,4	Producto comercial de suero	Murakami y col. (2004)
BSA f(221-222)	FP	315,0	-27,0	Proteinasa K	Abubakar y col. (1998)

^a Concentración de péptido necesaria para inhibir la actividad de la ECA en un 50%; ^b Presión arterial sistólica (valor medio); ^c Proteínas de origen bovino, salvo que se indique lo contrario; ^d Proteína de origen ovino; ^e Proteína de origen caprino. Adaptado de Hernández-Ledesma y col. (2011).

De entre las enzimas empleadas para la obtención de péptidos inhibidores de la ECA a partir de caseínas, la tripsina (EC 3.4.21.4) es la más utilizada (Maruyama y col., 1985 y 1987; Karaki y col., 1990). Esta enzima libera péptidos con residuos de lisina (K) y arginina (R) en su extremo C-terminal, lo que favorecería su unión a la ECA (López-Fandiño y col., 2006; **sección 2.3.2.3**). Los hidrolizados de caseína bovina derivados del empleo de tripsina no sólo manifiestan una potente AI-ECA *in vitro* sino también efectos antihipertensivos en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) tras su administración oral a dosis de 3 g de hidrolizado/kg de peso (Karaki y col., 1990). De la hidrólisis de la α_2 -CN bovina con tripsina se han identificado péptidos inhibidores de la ECA muy activos como los fragmentos peptídicos f(92-98), f(182-184), f(174-181) y f(174-179) que se corresponden con los péptidos FPQYLQY, TVY, FALPQYLK y FALPQY, respectivamente (Tauzin y col., 2002). Manso y López-Fandiño (2003) también han descrito la presencia de péptidos inhibidores de la ECA en hidrolizados de la κ -CN bovina, ovina y caprina con tripsina. Igualmente, la hidrólisis posterior del caseinomacropéptido correspondiente a la región C-terminal de la α_2 -CN bovina con pepsina incrementa la AI-ECA (IC_{50} =92 μ g/mL) y origina un hidrolizado con actividad antihipertensiva *in vivo* (Miguel y col., 2007). Asimismo, la hidrólisis de caseína ovina total y de la κ -CN ovina con pepsina, tripsina y quimotripsina también ha permitido la identificación de péptidos con una elevada AI-ECA y con actividad antihipertensiva en ratas espontáneamente hipertensas (Gómez-Ruiz y col., 2007; Miguel y col., 2010).

Por otro lado, la pepsina (EC 3.4.23.1) es también una enzima gástrica con preferencia por lugares de corte entre aminoácidos hidrofóbicos, utilizada para la obtención de péptidos antihipertensivos a partir de proteínas alimentarias (Je y col., 2004; Miguel y col., 2004; Katayama y col., 2008). Así por ejemplo, Contreras y col. (2009) utilizaron esta enzima, de un preparado enzimático comercial de la mucosa gástrica porcina y permitido por vía oral para ayudar a la digestión de proteínas, para hidrolizar la caseína bovina total y originar el producto comercial Lowpept® (Innaves S.A., Vigo, España). En este producto comercial se han identificado dos péptidos RYLGY y AYFYPEL, derivados de la α_1 -CN, que manifiestan tanto actividad inhibidora de la ECA *in vitro* como actividad antihipertensiva *in vivo* en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) (Anadón y col., 2010). La hidrólisis de la κ -CN con pepsina purificada también conduce a la formación de péptidos potentes inhibidores de la ECA ($IC_{50} \approx 10 \mu$ M) (López-Expósito y col., 2007).

Para obtener péptidos inhibidores de la ECA también se han empleado enzimas de origen bacteriano o fúngico. Así, se ha demostrado que una endopeptidasa de *Lb. helveticus* CM4 genera péptidos antihipertensivos a partir de sustratos constituidos por precursores peptídicos sintéticos (Ueno y col., 2004). También se han obtenido péptidos inhibidores de la ECA, derivados de la α_1 -CN y β -CN, tras la incubación de caseinatos de seis especies animales con una proteinasa aislada de *Lb. helveticus* PR4 (Minervini y col., 2003). Por otra parte, la hidrólisis de α_1 -CN y la α_2 -CN con una proteinasa de *Lb. helveticus* CP790 permitió la identificación de péptidos con actividad antihipertensiva. De ellos, la mayor AI-ECA correspondió al péptido YKVPQL f(104-109) procedente de la α_1 -CN ($IC_{50} = 22 \mu$ M) mientras que los péptidos liberados derivados de la α_2 -CN mostraron una menor inhibición de la ECA (Yamamoto y col., 1994; Maeno y col., 1996).

La hidrólisis enzimática de caseínas bovinas con una proteasa de *Aspergillus oryzae* también ha permitido la liberación de los péptidos antihipertensivos VPP e IPP, dos de los péptidos inhibidores de la ECA mejor caracterizados. El hidrolizado obtenido mostró una potente actividad inhibidora de la ECA y actividad antihipertensiva en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) (Mizuno y col., 2004) y en personas voluntarias (Mizuno y col., 2005). Calpis Co. (Japón) comercializó el hidrolizado lácteo resultante como AmealPeptide®. Posteriormente, la hidrólisis del caseinomacropéptido bovino con una preparación enzimática derivada de *Aspergillus niger* permitió la obtención de un hidrolizado enriquecido con el péptido IPP. Este producto se ha comercializado con el nombre de Tensguard™ (tensVIDA™) por la compañía holandesa DSM Food Specialties (Ponstein-Simarro Doorten y col., 2009). El péptido IPP también se ha identificado en el hidrolizado de β -CN producido por una proteasa de la membrana celular de *Lb. delbrueckii* CRL581 (Hebert y col., 2008).

Otras enzimas microbianas como la termolisina derivada de *Bacillus thermoproteolyticus* o la proteinasa K de origen fúngico se han evaluado también para la producción de péptidos inhibidores de la ECA a partir de distintas caseínas (Abubakar y col., 1998; Otte y col., 2007b). La comparación de la AI-ECA de los hidrolizados obtenidos con las distintas enzimas puso de manifiesto que los mejores resultados se obtuvieron mediante la hidrólisis de la β -CN y el caseinato sódico por la acción de la termolisina (Otte y col., 2007b).

2.4.1.2. Hidrolizados de proteínas del suero lácteo

Las proteínas del suero lácteo son moléculas globulares con numerosos motivos α -hélice y una alternancia de aminoácidos ácidos y básicos, hidrofílicos e hidrofóbicos en su secuencia (Madureira y col., 2010) (**Fig. 2.6**). Las proteínas mayoritarias, β -Lg y α -La, poseen una estructura rígida que les confiere resistencia frente a la actividad hidrolítica de enzimas endógenas de la leche como la plasmina (EC 3.4.21.7), una serina proteasa con actividad y características similares a la tripsina que, aunque hidroliza la α_{s1} -CN, la α_{s2} -CN y la β -CN, no parece activa sobre las proteínas del suero (Cassens y col., 1999).

A pesar de la relativa dificultad para generar péptidos bioactivos por hidrólisis de las proteínas del suero con enzimas digestivas existen estudios en los que se han identificado péptidos inhibidores de la ECA derivados de las fracciones activas de hidrolizados de β -Lg y de α -La obtenidos con tripsina (la enzima más empleada) o con una combinación de tripsina, quimotripsina y pepsina (Pihlanto-Leppälä y col., 2000). El heptapéptido ALPMHIR [β -Lg f(142-148)] es el péptido inhibidor de la ECA, derivado de la hidrólisis proteínas séricas con tripsina, más potente identificado hasta ahora ($IC_{50} = 42,6 \mu M$) (Mullally y col., 1997). También se conoce un producto comercial con propiedades antihipertensivas, comercializado en forma de polvo y con el nombre de BioZate® (Danisco Foods International, Le Sueur, Estados Unidos), que contiene péptidos derivados de la β -Lg resultantes de la hidrólisis de proteínas séricas con tripsina (Pins y Keenan, 2006). La hidrólisis de una fracción de proteínas del suero enriquecida en β -Lg y de un concentrado de proteínas del suero tratados con tripsina, con Protamex (complejo enzimático de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens*), con Corolase® PNL (preparación enzimática de *Aspergillus sojae*), con Corolase® PP (preparación de enzimas

pancreáticas porcinas) o con Corolase® 7089 (preparación enzimática de *Bacillus subtilis*), resultó en un aumento de la concentración del péptido ALPMHIR, que fue máxima (1.160 µg/mL) en el concentrado de proteínas del suero tras su hidrólisis durante dos horas con tripsina (Walsh y col., 2004). Sin embargo, la concentración de este péptido en los hidrolizados lácteos disminuyó hasta 5 µg/mL tras su digestión con enzimas gastrointestinales *in vitro* no detectándose, además, en el plasma de los pacientes normotensos tras su consumo mediante la ingestión de cápsulas (80 mg/día) (Walsh y col., 2004). Tanto este péptido como el péptido ALPM, derivado de la β -Lg f(142-145) (β -lactosina B), se han identificado también en un hidrolizado de proteínas del suero denominado WE80BG, comercializado en Japón (DMV, Japan; Murakami y col., 2004). Conviene destacar que, a pesar de su baja actividad inhibidora de la ECA ($IC_{50} = 928 \mu M$) la β -lactosina B manifiesta actividad antihipertensiva en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) (Murakami y col., 2004).

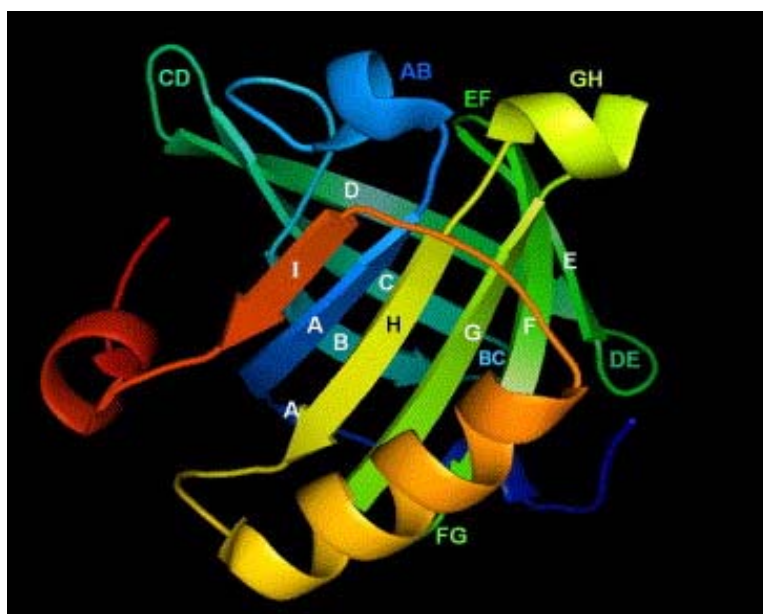


Fig. 2.6. Unidad monomérica de la variante A de la β -lactoglobulina bovina. La secuencia aminoacídica se encuentra coloreada siguiendo los colores del arcoiris empezando con el extremo N-terminal en azul y terminando con el extremo C-terminal en rojo. Fuente: Adams y col. (2006).

La producción de péptidos inhibidores de la ECA también se ha logrado mediante hidrólisis de la α -La y la β -Lg con proteasas microbianas como la termolisina, la proteinasa K y proteasas de la pared celular de diversas BAL (Abubakar y col., 1998; Hernández-Ledesma y col., 2002; Otte y col., 2007a; Guo y col., 2009). Así, de los estudios realizados hasta la fecha relativos a la hidrólisis de proteínas del suero lácteo con las enzimas proteinasa K, tripsina, actinasa E, termolisina, papaína, pepsina y quimotripsina se deduce que la mayor actividad inhibidora de la ECA y el mayor efecto antihipertensivo en ratas SHR se obtiene mediante la hidrólisis de dichas proteínas con la proteinasa K. De entre los péptidos identificados en los hidrolizados el péptido IPA β -Lg f(78-80) (β -lactosina A) fue el más activo tanto *in vitro* ($IC_{50} = 141 \mu M$) como *in vivo* en ratas SHR (Abubakar y col., 1998). Por otro lado, Hernández-Ledesma y col. (2002) identificaron en un hidrolizado de la β -Lg caprina con termolisina los péptidos LQKW, f(58-61) y LLF, f(103-

105) con una IC_{50} de 34,7 μM y 79,8 μM , respectivamente. Posteriormente, los mismos investigadores demostraron que ambos péptidos ejercían actividad antihipertensiva en ratas SHR tras su administración oral a una concentración de 10 mg/kg (Hernández-Ledesma y col., 2007). Recientemente, la proteasa N-Amano (EC.3.4.24.28) una mezcla proteolítica comercial procedente de *Bacillus subtilis* se ha utilizado en la producción de péptidos inhibidores de la ECA derivados de la β -Lg (Ortiz-Chao y col., 2009). Los resultados obtenidos han permitido la identificación y caracterización del heptapéptido SAPLRVY, derivado de la β -Lg f(36-42), con un IC_{50} de 8 μM . Este valor es considerablemente menor que el de cualquiera de los péptidos inhibidores de la ECA y derivados de la β -Lg identificados con anterioridad.

2.4.2. PRESENCIA DE PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA ECA (AI-ECA) EN PRODUCTOS LÁCTEOS FERMENTADOS

La fermentación natural o controlada de los alimentos se ha explotado durante muchos años para modificar, mantener o preservar sus propiedades nutritivas y/o sensoriales. En este contexto, las BAL se emplean tradicionalmente por la industria alimentaria como cultivos iniciadores. Durante el proceso fermentativo, tanto el sistema proteolítico de las BAL empleadas como cultivos iniciadores como el de la microbiota endógena potencialmente presente en el sustrato alimentario, se encargan de la hidrólisis de las proteínas de la leche. Los péptidos y aminoácidos derivados de la hidrólisis, principalmente, de las caseínas constituyen una fuente de nitrógeno esencial para el desarrollo de estos microorganismos contribuyendo, además, a las características organolépticas del producto final. Por otra parte, los péptidos liberados de la hidrólisis de las proteínas de la leche durante su fermentación manifiestan, en ocasiones, actividades biológicas interesantes. Por ello, la fermentación microbiana de la leche se considera una buena estrategia para la obtención de péptidos inhibidores de la ECA y/o de péptidos antihipertensivos (FitzGerald y Murray, 2006) (Tabla 2.5).

2.4.2.1. Leches fermentadas

Las BAL constituyen un grupo bacteriano empleado exitosamente en la fermentación de la leche para obtener derivados lácteos con actividad inhibidora de la ECA y/o con actividad antihipertensiva. En este sentido, se ha observado que leches fermentadas con BAL como *Lactobacillus helveticus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. casei*, *Lb. acidophilus*, *Lb. jensenii*, *Lb. delbrueckii* subesp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris* y *Enterococcus faecalis* manifiestan actividad inhibidora de la ECA debido a la liberación de péptidos inhibidores de esta enzima (Nakamura y col., 1995a y 1995b; Yamamoto y col., 1999; Gobbetti y col., 2000; Fuglsang y col., 2003; Hernández-Ledesma y col., 2004; Robert y col., 2004; Muguerza y col., 2006; Donkor y col., 2007; Jauhiainen y col., 2007; Ramchandran y col., 2007; Nielsen y col., 2009; Pihlanto y col., 2010; Otte y col., 2011).

Tabla 2.5. Actividad inhibidora de la ECA y actividad antihipertensiva en SHR de péptidos derivados de proteínas lácteas obtenidos por fermentación bacteriana.

Fragmento peptídico	Secuencia	IC ₅₀ (μ M) ^a	Máximo descenso de la PAS (mm Hg) ^b	Origen	Referencia
α _{s1} -CN f(1-9)	RPKHPIKHQ	13,4	-9,3	Queso Gouda	Saito y col. (2000)
α _{s1} -CN f(102-109)	KKYNVPQL	77,1	-11,5	Queso Manchego	Gómez-Ruiz y col. (2002); Miguel y col. (2010)
α _{s1} -CN f(146-147)	YP	720,0	-32,1	Fermentación con <i>Lb. helveticus</i> CPN4	Yamamoto y col. (1999)
β -CN f(58-68)	LVYFFPGPIPN	27,9	-28,0	Kéfir de leche de cabra	Miguel y col. (2010); Quirós y col. (2005)
β -CN f(58-76)	LVYFFPGPIPNSLPQNIPP	5,2	-15,0	Fermentación con <i>E. faecalis</i>	Miguel y col. (2006); Quirós y col. (2007)
β -CN f(60-68)	YPPFGPIPN	14,8	-7,0	Queso Gouda	Saito y col. (2000)
β -CN f(74-76)	IPP	5,0	-28,3	Fermentación con <i>Lb. helveticus</i> y <i>S. cerevisiae</i>	Nakamura y col. (1995a, b)
β -CN f(84-86)	VPP	9,0	-32,1	Fermentación con <i>Lb. helveticus</i> y <i>S. cerevisiae</i>	Nakamura y col. (1995a, b)
β -CN f(133-138)	LHLPLP	5,5	-21,9	Fermentación con <i>E. faecalis</i>	Miguel y col. (2006); Quirós y col. (2007)
β -CN f(133-139)	LHLPLPL	425,0	-7,7	Fermentación con <i>E. faecalis</i>	Miguel y col. (2006); Quirós y col. (2007)
β -CN f(197-206)	VLGPVRGPFP	137,0	-16,2	Fermentación con <i>E. faecalis</i>	Miguel y col. (2006); Quirós y col. (2007)
β -CN f(201-209)	VRGPFPIIV	599,0	-16,1	Fermentación con <i>E. faecalis</i>	Miguel y col. (2006); Quirós y col. (2007)

^a Concentración de péptido necesaria para inhibir la actividad original de la ECA en un 50%; ^b Presión arterial sistólica (valor medio).

Adaptado de Hernández-Ledesma y col. (2011).

Aunque, en general los estudios sobre la actividad inhibidora de la ECA y la actividad antihipertensiva de los productos lácteos fermentados se han realizado con leche de vaca, también se ha investigado la AI-ECA de yogures fabricados con leche de oveja (Chobert y col., 2005; Papadimitriou y col., 2007) o camella (Shuangquan y Miyamoto, 2008) y en kéfir de leche de cabra (Quirós y col., 2005). Igualmente, de los estudios realizados hasta la fecha se desprende que *Lb. helveticus* constituye la BAL más evaluada para la obtención de péptidos inhibidores de la ECA derivados de la fermentación de la leche de diversas especies animales (Yamamoto y col., 1994; Fuglsang y col., 2003; Stefanova y col., 2009).

De interés ha sido también la identificación de péptidos inhibidores de la ECA derivados de leches o caseinatos fermentados con diversas especies bacterianas. Los péptidos inhibidores de la ECA, identificados en las leches fermentadas y mejor caracterizados hasta la fecha son los tripéptidos VPP derivado de la β -CN f(84-86) e IPP derivado de la β -CN f(74-76) y κ -CN f(108-110). Ambos péptidos fueron inicialmente identificados en una leche fermentada comercializada en Japón con el nombre de Ameal S® (Calpis Co., Japón), obtenida por fermentación de la leche de vaca con una cepa de *Lb. helveticus* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Nakamura y col., 1995a). Ambos péptidos se han identificado también en un producto lácteo fermentado preparado con *Lb. helveticus* LBK-16H y denominado Evolus® (Valio Ltd, Finlandia). Ambos productos deben a estos tripéptidos su efecto antihipertensivo, comprobado tanto en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) (Nakamura y col., 1995b) como en personas hipertensas (Hata y col., 1996; Seppo y col., 2002 y 2003). Los péptidos VPP e IPP también se han detectado en la leche de vaca fermentada con *Lb. delbrueckii* subesp. *bulgaricus* Lb1466 y *St. thermophilus* St1342, conjuntamente con otras BAL probióticas (Donkor y col., 2007). Por otra parte, conviene destacar que en una leche fermentada con una cepa de *Lb. helveticus* se identificó el dipéptido YP inicialmente encriptado en la α s1-CN f(146-147) y f(159-160), β -CN f(114-115) y κ -CN f(58-59) (Yamamoto y col., 1999). A pesar de la moderada actividad inhibidora de la ECA de este dipéptido (IC_{50} = 720 μ M), su actividad antihipertensiva en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) fue similar a la de los tripéptidos VPP e IPP.

La fermentación de la leche con otras BAL también ha dado lugar a péptidos inhibidores de la ECA y/o con actividad antihipertensiva. Así por ejemplo, en leches fermentadas con las cepas de *E. faecalis* CECT5727, CECT5728, CECT5826 y CECT5827 de origen lácteo se identificaron dos péptidos inhibidores de la ECA, derivados de la β -CN, con las secuencias LHLPLP f(133-138) y LVYPFPGPIPNLQNP f(58-76) (Muguerza y col., 2006). Ambos péptidos mostraron valores de IC_{50} inferiores a 5 μ M y un potente efecto antihipertensivo en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) a dosis de entre 0,5 y 3 mg/kg y 3-6 mg/kg, respectivamente (Miguel y col., 2006; Quirós y col., 2007). Igualmente, los hidrolizados procedentes de la fermentación de leche de vaca con las cepas previamente citadas mostraron una AI-ECA con valores IC_{50} de 34-59 μ g de proteína/mL, así como actividad antihipertensiva en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) (Miguel y col., 2005; Muguerza y col., 2006; Regazzo y col., 2010). Por otra parte, también se ha demostrado la utilidad de bacterias como *Bifidobacterium bifidum* MF 20/5 y de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus*, como cultivos individuales o en combinación con BAL, en la liberación de péptidos con actividad inhibidora de la ECA derivados

de la fermentación de diversos sustratos lácteos (Belem y col., 1999; Hamme y col., 2009a y b; González-González y col., 2011).

Finalmente, conviene señalar que en algunas ocasiones la hidrólisis de las proteínas durante la fermentación de la leche no es suficiente para liberar los péptidos activos, por lo que dicha fermentación debe combinarse con un proceso previo o posterior de hidrólisis de la leche con enzimas digestivas (Rokka y col., 1997; Saito y col., 1997; Pihlanto-Leppälä y col., 1998; Hernández-Ledesma y col., 2004) o con enzimas proteolíticas de otros orígenes (Chen y col., 2007; Tsai y col., 2008).

2.4.2.2. Quesos

El proceso de elaboración del queso (**Fig. 2.7**) incluye, generalmente, una etapa final de maduración en la que el producto adquiere sus características organolépticas típicas. Durante esta etapa, la mayoría de las proteínas lácteas se degradan por acción de enzimas endógenas de la leche, enzimas microbianas y por la actividad de los coagulantes añadidos, dando lugar a un gran número de péptidos algunos de los cuales pueden manifestar actividad inhibidora de la ECA. El grado de proteolisis durante la producción del queso y, por tanto, la formación y/o degradación de péptidos inhibidores de la ECA dependen del tratamiento térmico aplicado a la leche, el tipo de coagulante (animal o vegetal), el cultivo iniciador empleado, el manejo de la cuajada, salado y prensado, y las condiciones de maduración como el pH, el tiempo, la temperatura, la humedad y la posible presencia de microbiota secundaria.

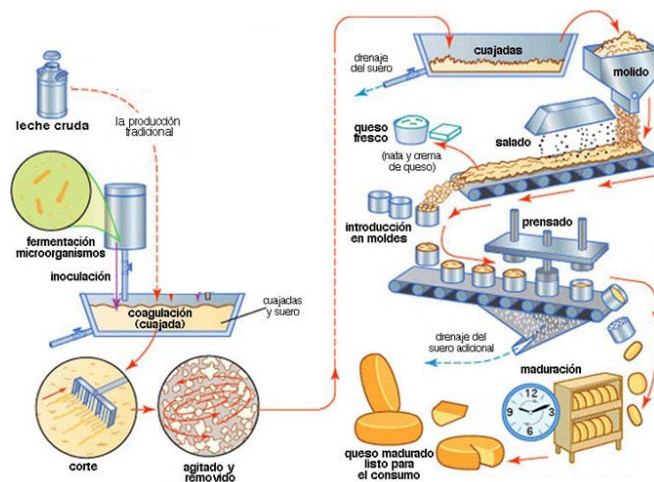


Fig. 2.7. Esquema del proceso general de elaboración de queso. Fuente: www.icolac.com (página web consultada el 15/05/2013).

La proteolisis que ocurre durante la maduración del queso es responsable tanto del incremento de la actividad inhibidora de la ECA como de su posible disminución. Dicha disminución se debe a la degradación de los péptidos bioactivos por acción de las enzimas endógenas de la leche, los coagulantes añadidos y/o las enzimas microbianas, especialmente en los quesos de maduración prolongada (Addeo y col., 1992; Meisel, 1997; Ryhänen y col., 2001). El efecto de la maduración sobre la actividad inhibidora de la ECA se ha evaluado en quesos

obtenidos de leche cruda o pasteurizada de oveja, inoculada con BAL como cultivos iniciadores y coagulada con cuajo animal. En estos quesos, los valores de actividad inhibidora de la ECA, determinados inicialmente a los 15 días de maduración, aumentaron hasta alcanzar valores máximos a los ocho meses de maduración y, sin embargo, decrecieron en los quesos madurados durante 12 meses (Gómez-Ruiz y col., 2002).

La presencia de péptidos inhibidores de la ECA se ha determinado en una gran variedad de quesos de origen suizo, francés, español, italiano, y finés (Smacchi y Gobbetti, 1998; Saito y col., 2000; Gómez-Ruiz y col., 2004; Bütikofer y col., 2007; Bütikofer y col., 2008). Así, por ejemplo, péptidos con AI-ECA como el LVYPFPGPIPNSLPQ derivado de la β -CN f(58-72) se ha identificado en los quesos Crescenza, Italico, Mozzarella, Cheddar, Gouda y Blue (Smacchi y Gobbetti, 1998; Gobbetti y col., 2002) y el péptido DKIHP derivado de la β -CN f(47-51) en quesos españoles como el Manchego, Roncal, Idiazábal, Cabrales y en quesos elaborados con leche de cabra (Gómez-Ruiz y col., 2006). Por otro lado, de la evaluación de la AI-ECA y de la actividad antihipertensiva en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) de la fracción peptídica de quesos comerciales de las variedades Gouda, Edam, Emmental, Camembert, Havarti y azul se concluyó que el queso Gouda, madurado durante 8 meses, era el que manifestaba la actividad antihipertensiva más potente. Los péptidos YPFPGPIPNI derivado de la β -CN f(60-68) y RPKHPIKHQ derivado de la α s1-CN f(1-9) identificados en esta variedad de queso también exhibieron una potente AI-ECA (IC_{50} de 14,8 y 13,4 μ M, respectivamente) pero una débil actividad antihipertensiva. Probablemente la potente actividad antihipertensiva de la fracción peptídica del queso Gouda se deba a la hidrólisis e inactivación por proteasas o peptidasas intestinales de los péptidos mencionados. También los péptidos VPP e IPP se han identificado y cuantificado en una gran variedad de quesos comerciales duros, semi-duros y blandos de diversa procedencia (Bütikofer y col., 2007 y 2008; Meyer y col., 2009). La presencia de elevadas concentraciones de los péptidos VPP e IPP en diversas variedades de quesos suizos podría estar asociada al uso de *Lb. helveticus* como cultivo iniciador (Meyer y col., 2009). No obstante, a pesar de que elevadas concentraciones de VPP e IPP en los quesos constituye un atributo de su valor biológico, su concentración suele ser variable no solo entre las diferentes variedades de quesos sino, también, entre quesos de una misma variedad (Bütikofer y col., 2008, y Meyer y col., 2009). Por lo tanto, es conveniente el desarrollo de procesos reproducibles y estandarizados de fabricación de los quesos para elaborar productos con un alto contenido en péptidos antihipertensivos.

La actividad inhibidora de la ECA se ha evaluado también en quesos madurados con hongos, siendo el más activo el queso tradicional noruego Gamalost (Pripp y col., 2006). También se han identificado péptidos con actividad inhibidora de la ECA y/o actividad antioxidante como el péptido VPKVK derivado de la β -CN en quesos de leche de oveja y cabra, coagulada con enzimas del cardo común (*Cynara cardunculus*) (Silva y col., 2006).

2.4.3. ESTUDIOS CLÍNICOS EN HUMANOS

A pesar de que, como se ha mencionado en los apartados anteriores, se han identificado un gran número de péptidos con actividad inhibidora de la ECA su posible actividad antihipertensiva

en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y en personas solamente se ha evaluado en un número muy reducido de ellos (Jauhiainen y Korpela, 2007, Saito, 2008; Korhonen, 2009). En la mayoría de los estudios clínicos el consumo de hidrolizados de proteínas lácteas y de productos lácteos fermentados por voluntarios humanos hipertensos origina una disminución de la presión sanguínea de hasta 14,1 mmHg (Korhonen, 2009). De esta manera, como ya se ha comentado en otras secciones de esta memoria, se ha determinado que el hidrolizado de proteínas del suero de leche denominado BioZate® (Davisco, US) posee propiedades antihipertensivas (Pins y Keenan, 2006). Igualmente, el péptido FFVAPFPEVFGK comercializado bajo la denominación C12 Peption® (DMV International, Holanda), obtenido de la hidrólisis de caseínas de la leche de vaca con tripsina, ha demostrado un efecto antihipertensivo en personas con hipertensión leve. Por otra parte, de las leches fermentadas aquéllas que lo están por una combinación de *Lb. casei* TCM0409 y *St. thermophilus* TCM1543 (Kawase y col., 2000) o de *Lb. casei* var. Shirota y *L. lactis* YIT 2027 (Inoue y col., 2003) también exhibieron efectos antihipertensivos en personas hipertensas aunque, en el último caso, la actividad hipotensora se atribuyó a la presencia del ácido γ -aminobutírico en los hidrolizados lácteos (10-12 mg/mL).

De los resultados por meta-análisis de los estudios clínicos realizados con hidrolizados de proteínas alimentarias como los mencionados previamente, se ha determinado que dichos hidrolizados originan efectos antihipertensivos con valores estimados de reducción de la PAS de 4,8 a 5,1 mmHg y de la PAD de 2,2 a 2,4 mmHg, respectivamente (Pripp, 2008; Xu y col., 2008). Por ello, debido a un efecto tan moderado de la presión arterial es posible que dichos hidrolizados no constituyan un tratamiento eficaz en estados de hipertensión severa donde es conveniente una reducción más potente de la HTA. Sin embargo, su consumo puede constituir una alternativa o suplemento al tratamiento farmacológico en estados de hipertensión leve, siempre en combinación con una dieta adecuada y hábitos de vida saludables (Pripp, 2008). Las leches comercializadas bajo las marcas Ameal S® (anteriormente Calpis®, Calpis Co.), Evolus® (Valio Ltd.), y en España Kaiku VitaTEN® cuyo componente principal es Evolus®, contienen los péptidos antihipertensivos VPP e IPP. También Calpis Co. comercializa un hidrolizado lácteo en polvo con el nombre AmealPeptide®, además de tabletas masticables y cápsulas (Ameal bp®) (Fig. 2.8.) que contienen los tripéptidos activos VPP e IPP.



Fig. 2.8. Ejemplos de productos comercializados que contienen los péptidos antihipertensivos IPP y VPP.

A pesar de algunos resultados negativos en la mayoría de los estudios clínicos con hidrolizados lácteos, conteniendo péptidos inhibidores de la ECA, se ha observado un efecto antihipertensivo moderado pero significativo de los mismos (Hirota y col., 2007; Engberink y col., 2008; Van der Zander y col., 2008; Van Mierlo y col., 2009). Sin embargo, el efecto beneficioso es mayor en poblaciones como las de Japón, Finlandia y Taiwán (Geleijnse y Engberink, 2010), lo que podría estar relacionado con otros componentes de la dieta que pudieran modular el efecto de los péptidos antihipertensivos en la presión arterial.

2.5. BACTERIAS LÁCTICAS

Las bacterias productoras de ácido láctico, bacterias ácido-lácticas o bacterias lácticas (BAL) son microorganismos de gran interés no sólo en la industria alimentaria en la que se utilizan como cultivos iniciadores para la elaboración de una gran variedad de alimentos fermentados, sino también en la farmacéutica, en forma de preparaciones probióticas. Además, estas bacterias podrían también emplearse como factorías celulares o biorreactores para la producción de sustancias de interés como la producción de péptidos antihipertensivos y de otros péptidos y proteínas con actividad fisiológica deseable. Asimismo, conviene resaltar el efecto nutricional y saludable de la ingestión de productos lácteos fermentados con BAL como resultado de la producción de metabolitos bacterianos, componentes de la pared celular (Furushiro y col., 1990; Nakajima y col., 1995), compuestos antimicrobianos de naturaleza peptídica (bacteriocinas) (de Vuyst y Leroy, 2007) y de péptidos procedentes de la actividad hidrolítica de sus enzimas proteolíticas sobre las proteínas alimentarias originando la liberación de péptidos bioactivos con actividades biológicas saludables y deseables (FitzGerald y Murray, 2006). No obstante, a pesar de su papel tecnológico y saludable en la producción de alimentos fermentados algunas BAL pueden alterar los alimentos, incrementar la presencia de aminas biógenas e, incluso, algunas BAL se consideran como microorganismos responsables de infecciones en las personas (Franz y col., 2003; Foulquie-Moreno y col., 2006; Ogier y Serror, 2008).

2.5.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y CONSIDERACIONES TAXONÓMICAS

Las BAL constituyen un grupo de microorganismos Gram-positivos muy heterogéneo desde el punto de vista morfológico y fisiológico, cuya principal característica es la producción de ácido láctico como producto mayoritario del metabolismo fermentativo de los carbohidratos. En general, se trata de microorganismos de morfología bacilar o cocoide, no esporulados, microaerófilos o anaerobios facultativos, con un contenido de guanina y citosina (G+C) inferior a 50 mol%, que toleran bien valores bajos de pH y que carecen de citocromos y catalasa *sensu stricto* (Stiles y Holzapfel, 1997; Klein y col., 1998; Cintas y col., 2000; Carr y col., 2002). El grupo de las BAL comprende microorganismos de 26 géneros distintos entre los que se encuentran los del género *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*, distribuidos en 6 familias del orden *Lactobacillales* (Axelsson, 1998; Cintas y col., 2000, 2001; Sánchez, 2008) (**Fig. 2.9**). Las BAL se

localizan en hábitats ricos en nutrientes, caracterizados por la presencia de carbohidratos solubles y productos de la degradación de proteínas y vitaminas y con baja tensión de oxígeno, como la leche y productos lácteos, productos cárnicos y vegetales fermentados, frutas y hortalizas frescas, ensilados, pescado y otros productos de la pesca y sus derivados (Egan, 1983; Lindgren y Dobrogosz, 1990; Stiles, 1996; Muñoz-Atienza y col., 2011; Hurtado y col., 2012). Asimismo, las BAL forman parte de la microbiota normal del tracto gastrointestinal y urogenital y de las mucosas de los mamíferos. Algunas BAL se han aislado también del estiércol y de las aguas residuales urbanas e industriales (Vaughan y col., 2002; Axelsson, 1998; Cintas y col., 2000; del Campo y col., 2001).

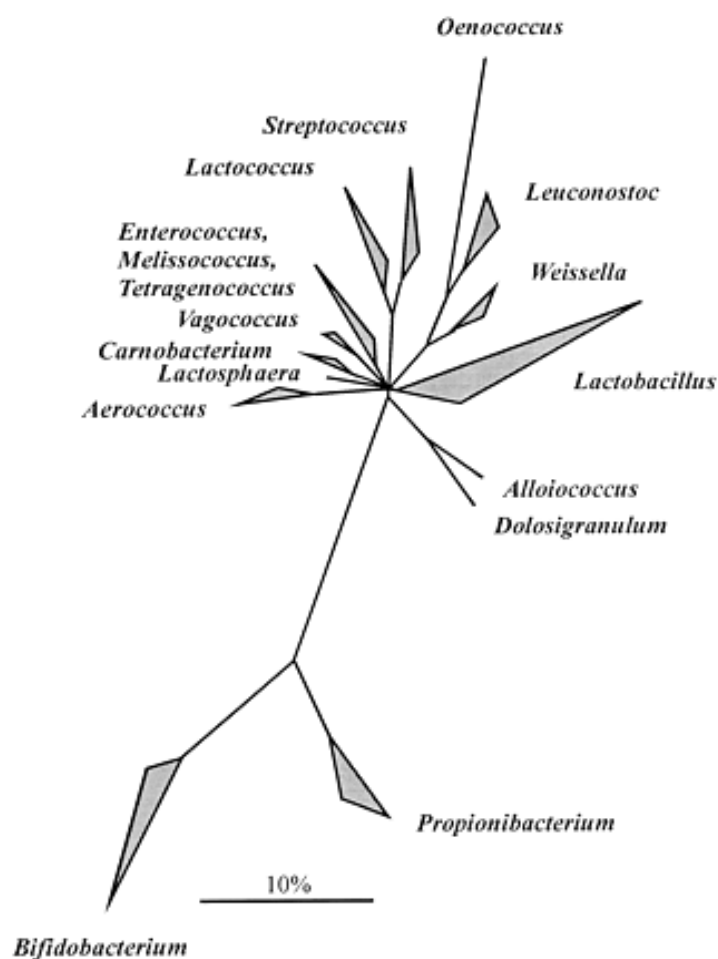


Fig. 2.9. Distribución basada en el análisis comparativo de la secuencia del ARNr 16S de los principales géneros de BAL y de otras bacterias Gram-positivas de los géneros *Bifidobacterium* y *Propionibacterium*. Fuente: Holzapfel y col. (2001).

2.5.2. BACTERIAS LÁCTICAS Y ALIMENTOS

Los alimentos fermentados, consumidos por la humanidad desde tiempos inmemoriales parecen tener su origen en la civilización sumeria (5.000–4.000 a.C.) (Ross y col., 2002). Dentro del grupo de alimentos fermentados se engloban más de 3.500 productos elaborados a partir de materias primas como la leche, frutas, vegetales, raíces, cereales, carne y pescado (**Tabla 2.6**),

entre los que se incluyen: (i) derivados de la leche (por ej.: queso, yogur y kéfir); (ii) pan y otros derivados de los cereales (por ej.: “sourdough” [derivado de diversos cereales] y “ogi” [derivado del maíz o sorgo]); (iii) bebidas (por ej.: vino, cerveza y licores); (iv) derivados de vegetales (por ej.: “kimchi” [derivado de la col y otros vegetales], “sauerkraut” [derivado de la col] y “tempeh” [derivado de la soja]); y (v) derivados del pescado (por ej.: “surströmming” [arenque fermentado] y “nuoc nam” [salsa elaborada a partir de pescado fermentado]). El empleo de la fermentación en la industria alimentaria contribuye de manera importante al enriquecimiento de la dieta humana, tanto por la amplia diversidad de productos que se obtienen mediante este proceso como por la generación durante este proceso de vitaminas, proteínas y aminoácidos, ácidos grasos esenciales y otros compuestos que aportan un valor añadido a estos alimentos y, por tanto, a la salud y/o el bienestar del consumidor (Steinkraus, 2002; Giraffa, 2004).

Tabla 2.6. Contribución de las BAL y otros microorganismos a la producción de diversos alimentos fermentados.

Producto	Microorganismo	Sustrato
Vino, cerveza	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , BAL	Uvas, grano, lúpulo
Pan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , BAL	Trigo, centeno
Queso Cheddar	<i>Lactococcus (cremoris, lactis)</i> y <i>Leuconostoc</i>	Leche
Queso suizo	<i>Lactobacillus (delbrueckii, bulgaricus, helveticus)</i>	Leche
Quesos blandos	<i>Carnobacterium piscicola</i> , <i>Brevibacterium linens</i>	Leche
Yogures	<i>St. thermophilus</i> y <i>Lb. bulgaricus</i>	Leche
Kéfir	Lactococos, lactobacilos, otras BAL y levaduras	Leche
Carnes fermentadas	Pediococos y otras BAL, estafilococos	Carne de cerdo y ternera
Sauerkraut	<i>L. lactis</i> , <i>Lactobacillus (brevis, plantarum, curvatus, sakei)</i>	Col
Salsa de soja	<i>Aspergillus oryzae/soyae</i> , lactobacilos y <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Habas de soja y trigo
Vegetales	Enterococos, lactococos, lactobacilos	Vegetales
Pescado	<i>Carnobacterium (piscicola, divergens)</i>	Pescado

Adaptado de Ross y col. (2002).

A pesar de que la fermentación se ha explotado durante miles de años como método para la elaboración y conservación de los alimentos, no fue hasta mediados del siglo XIX cuando Pasteur demostró que los microorganismos eran los responsables de estos procesos fermentativos (Caplice y Fitzgerald, 1999; Ross y col, 2002). Tradicionalmente, estos alimentos

se elaboraban mediante procesos empíricos basados en la actividad de la microbiota presente de forma natural en las materias primas (Cintas y Casaus, 1998). Sin embargo, en la actualidad, las fermentaciones industriales son procesos estrictamente controlados que se basan en la adición deliberada a la materia prima de cultivos de microorganismos específicos vivos (bacterias, hongos y/o levaduras) (**Tabla 2.6**), lo que permite garantizar y estandarizar las características organolépticas y reológicas del producto final, así como potenciar su calidad higiénico-sanitaria y alargar su vida útil. En este sentido, las BAL desempeñan un papel muy relevante en la elaboración de alimentos fermentados de forma que, según estimaciones recientes, su empleo para este fin conjuntamente con su comercialización en forma de probióticos representa un valor de mercado de unos 100.000 millones de euros (de Vos, 2011).

Los microorganismos que se adicionan deliberadamente a los alimentos pueden clasificarse en función de su finalidad principal en: (i) cultivos iniciadores, que son aquellos que se adicionan para inducir cambios en la textura, aroma, sabor, color, digestibilidad y/o palatabilidad de las materias primas permitiendo la obtención de unos productos finales con unas características organolépticas y reológicas diferentes y deseables (Smit y col., 2005; Leroy y col., 2006; Bron y Kleerebezem, 2011); (ii) cultivos protectores, que pueden definirse como aquellos que se utilizan para mejorar la calidad higiénico-sanitaria y seguridad de los alimentos así como para incrementar su vida útil mediante la inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos y alterantes potencialmente presentes en los alimentos (Holzapfel y col., 1995; Vermeiren y col., 2004); y (iii) cultivos adjuntos, que se adicionan con una finalidad distinta a las anteriores como puede ser la aceleración de la maduración de determinados tipos de quesos y la producción del sabor y aroma deseado mediante la lisis celular de los cultivos iniciadores empleados (O'Sullivan y col., 2002; Hickey y col., 2004).

2.5.2.1. Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas

Uno de los problemas más arduos a los que se enfrenta la industria alimentaria es el de asegurar la calidad higiénica y sanitaria de los alimentos que produce, lo que conlleva la búsqueda de metodologías que eviten la presencia y desarrollo de microorganismos alterantes y/o productores de toxiinfecciones alimentarias. La mayoría de las técnicas de conservación de los alimentos de las que dispone actualmente la industria alimentaria están basadas en procesos tecnológicos complejos y en el empleo de aditivos químicos. Puesto que los consumidores actuales demandan alimentos de mejor calidad, menos procesados, más naturales, libres de aditivos químicos y más seguros en los últimos años se ha sugerido que la industria alimentaria debería promover el empleo de “bioconservantes” o “bioconservadores”, términos que engloban a compuestos antimicrobianos de origen animal, vegetal o microbiano y que, en general, no parecen poseer efectos perjudiciales para la salud de los consumidores (Stiles, 1996; Cintas y Casaus, 1998). En este sentido, además de ejercer una importante función tecnológica en los alimentos procesados las BAL poseen la capacidad de inhibir el desarrollo de un gran número de microorganismos patógenos y/o alterantes potencialmente presentes en los alimentos. Entre los principales mecanismos de antagonismo microbiano de las BAL se incluyen la competencia por los nutrientes del sustrato y la formación de ácidos orgánicos (ácido láctico y ácido acético, principalmente) con el consiguiente descenso del pH. No obstante, las BAL también producen

otras sustancias antimicrobianas como etanol, dióxido de carbono, diacetilo, acetaldehído, peróxido de hidrógeno y otros metabolitos del oxígeno, isómeros D de los aminoácidos, reuterina, compuestos no proteicos de pequeño tamaño molecular y, por último, péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal denominados bacteriocinas. Estas últimas son las más interesantes tecnológicamente, tanto por su posible empleo como conservadores naturales en la industria alimentaria como por sus aplicaciones como antimicrobianos en medicina humana y veterinaria y en la producción animal (Gálvez y col., 2008; Klostermann y col., 2008; Khan y col., 2010; Borrero y col., 2011) (**Fig. 2.10**). Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal que se liberan al medio exocelular con o sin modificaciones postraduccionales y que muestran una gran heterogeneidad en relación con las bacterias que las producen y sus propiedades bioquímicas y genéticas, espectro antimicrobiano y modo de acción (Nes y col., 1996; Ennahar y col., 2000; Cintas y col., 2001; Skaugen y col., 2003; Franz y col., 2003; Cotter y col., 2005). Una vez ejercen su actividad antimicrobiana en los alimentos, las bacteriocinas son inactivadas por las enzimas proteolíticas del tracto gastrointestinal de los consumidores y no parecen ser tóxicas ni inmunógenas (Klaenhammer, 1993; Jack y col., 1995; Nes y col., 1996).

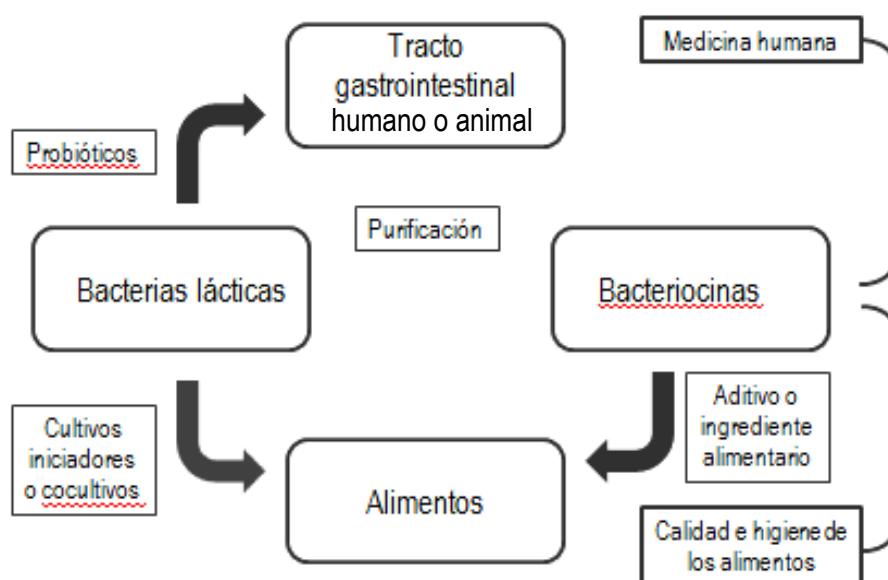


Fig. 2.10. Posibles aplicaciones de las BAL y su bacteriocinas. Adaptado de De Vuyst y Leroy (2007).

En la actualidad, se considera que la tecnología de las "barreras" u "obstáculos" es la más adecuada para asegurar la calidad higiénica y sanitaria de los alimentos. Esta tecnología aboga por la utilización combinada de diversas formas de conservación tradicionales (temperatura, a_w , potencial redox, aditivos químicos, etc.) con nuevas técnicas de conservación como las de envasado al vacío o en atmósferas modificadas, presiones elevadas, pulsos eléctricos y la utilización de bacteriocinas (Basanta, 2008; Borrero, 2011). Así pues, dado que las BAL bacteriocinogénicas poseen el potencial de inhibir o eliminar el desarrollo de microorganismos alterantes y patógenos de los alimentos, el empleo de estas bacterias y/o sus metabolitos como bioconservantes alimentarios, formando parte de un sistema de barreras múltiples, constituye

una alternativa aceptable por los consumidores, las agencias sanitarias y las empresas alimentarias, lo que permitiría obtener productos más naturales y saludables y con menos aditivos químicos (Stiles, 1996; Cintas y Casaus, 1998; O'Sullivan y col., 2002; Ross y col., 2002; Devlieghere et al., 2004; Deegan y col., 2006).

2.5.3. BACTERIAS LÁCTICAS Y SALUD

2.5.3.1. Las bacterias lácticas como cultivos probióticos

Los probióticos se definen como microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, ejercen efectos beneficiosos en la salud y/o el bienestar del hospedador (FAO/WHO, 2002; Vasiljevic y Shah, 2008). La mayoría de las preparaciones probióticas para especialidades farmacéuticas, para alimentos (principalmente alimentos infantiles y derivados lácteos) y como aditivos en los piensos para animales incluyen microorganismos del género *Bifidobacterium* y del grupo de las BAL, principalmente del género *Lactobacillus* (Holm, 2003; Leroy y col., 2006). Sin embargo, algunas cepas de las especies *E. faecium* y *E. faecalis* también se emplean como probióticos en personas y animales (Bellomo y col., 1980; Owings y col., 1990; Fukata y col., 1991; Franz y col., 2011). El que las BAL sean candidatas para su empleo como probióticos se debe, entre otras razones, a su consideración como microorganismos generalmente seguros (GRAS, del inglés *Generally Recognized as Safe*) o de acuerdo con la denominación europea microorganismos QPS (del inglés *Qualified Presumption of Safety*) (Stiles, 1996). Generalmente la selección de BAL para su empleo como probióticos se basa, en primer lugar, en el aislamiento de bacterias comensales de las mucosas oral, gastrointestinal y genitourinaria de individuos sanos de la misma especie y, posteriormente, en la evaluación del grado de cumplimiento de los requisitos que se detallan en la **Tabla 2.7.** (Sohier y col., 2008; Vasiljevic y Shah, 2008).

Tabla 2.7. Requisitos recomendados para la selección de cepas probióticas con aplicación comercial.

Requisitos	Propiedad
Seguridad	Origen (misma especie)
	Seguridad e inocuidad (no patogénicas, no tóxicas, no alergénicas y no mutagénicas o carcinogénicas)
	Ausencia de factores de virulencia y de resistencias adquiridas a antibióticos
Tecnológicos	Genéticamente estables
	Supervivencia y viabilidad durante la elaboración, transporte y almacenamiento de los alimentos
	Buenas propiedades sensoriales
	Resistencia a fagos
	Producción a gran escala
Funcionalidad	Tolerancia a bajos niveles de pH y al jugo gástrico
	Tolerancia a las sales biliares
	Proliferación y colonización del tracto gastrointestinal

	Efectos beneficiosos para la salud documentados y validados
Fisiológicos	Inmunomodulación
	Actividad antagonista frente a patógenos gastrointestinales
	Propiedades antimutagénicas y anticarcinogénicas
	Metabolismo del colesterol
	Metabolismo de la lactosa

Adaptado de Vasiljevic y Shah (2008).

La capacidad de producir un efecto beneficioso para la salud, que es la propiedad esencial que caracteriza a un probiótico es una característica dependiente de cada cepa. En consecuencia, los efectos saludables alegados deberán demostrarse “caso por caso” mediante métodos científicos validados y aceptados. Entre los numerosos efectos beneficiosos derivados del consumo de probióticos se incluyen: (i) la mejora de la digestibilidad de la lactosa; (ii) la reducción del riesgo de padecer ciertos tipos de diarrea como la provocada por rotavirus y *Clostridium difficile* y la reducción de sus síntomas o duración; (iii) el tratamiento y la reducción del riesgo de padecer alergias; (iv) la reducción del riesgo de mutagenicidad y carcinogenicidad especialmente del cáncer de colon; (v) la reducción del nivel de colesterol sanguíneo; (vi) la disminución de infecciones urogenitales y de úlceras originadas por *H. pylori*; (vii) la modulación del sistema inmune; (viii) la actividad antioxidante; (ix) la mejora en la absorción del calcio; (x) la mejora de los procesos intestinales inflamatorios; y (xi) la reducción de la presión arterial (Holzapfel y col., 1998; Tsai y col., 2004; Ljungh y Wadström, 2006; Nguyen et al., 2007).

2.5.3.2. Bacterias lácticas y enfermedad

Los consumidores perciben las BAL como algo “natural” por lo que su presencia en los alimentos tiene gran aceptabilidad, mientras la mayoría de ellas se reconocen como microorganismos seguros (GRAS y/o QPS). No obstante, algunas BAL se han involucrado en el desarrollo de infecciones humanas (Aguirre y Collins, 1993; Gasser, 1994; Bernardeau y col., 2008; Ogier y col., 2008; Casalta y col., 2008) y, en particular, las BAL del género *Enterococcus* poseen una consideración ambigua en cuanto a su seguridad y uso en los alimentos y su empleo como probióticos (**sección 2.6.2**). Asimismo, en la mayoría de infecciones por BAL éstas actúan como patógenos oportunistas que afectan a individuos con defensas debilitadas como resultado de disfunciones del sistema inmune, empleo de quimioterapia o daño tisular. Además, conviene destacar que dichas infecciones suelen asociarse a enfermedades subyacentes predisponentes a la infección mientras que el origen de los microorganismos implicados suele ser la microbiota habitual del paciente. También se conoce que las BAL implicadas en infecciones en personas suelen tener un origen hospitalario y son genéticamente diferentes de las de origen alimentario, ambiental o de uso farmacéutico como probióticos (Adams, 1999; Švec y col., 2007; Ogier y Serró, 2008).

2.5.4. SISTEMA PROTEOLÍTICO DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS

El sistema proteolítico de las BAL juega un papel esencial en la supervivencia y desarrollo de estos microorganismos en medios ricos en proteínas. Las BAL son microorganismos muy restrictivos en cuanto a sus requerimientos nutricionales y se caracterizan por precisar una

fuente exógena de aminoácidos, ya que son auxótrofas para casi todos los 20 aminoácidos esenciales. Dado que en la leche las concentraciones de péptidos y aminoácidos libres son pequeñas y, por tanto insuficientes para su desarrollo, las BAL dependen fundamentalmente de su sistema proteolítico para proliferar en este medio (Smit y col., 2005). Por otra parte, el sistema proteolítico de las BAL posee una gran importancia desde el punto de vista tecnológico dado que contribuye de manera crucial al desarrollo de la textura, aromas y sabores de los productos lácteos fermentados, además de estar implicado en la liberación de péptidos bioactivos derivados de las caseínas y otras proteínas lácteas (Kok y de Vos, 1994; Christensen y col., 1999; Doeven y col., 2005).

La degradación de caseínas por las BAL se inicia por la acción de una proteinasa ligada a la pared celular (PPC), lo que resulta en la liberación de un gran número de oligopéptidos. A continuación, éstos oligopéptidos son transportados al interior de las BAL por sistemas específicos de transporte de péptidos (Fang y col., 2000). Por último, una vez dentro de las células, los péptidos son degradados de nuevo por la acción conjunta y coordinada de varias peptidasas, dando lugar a péptidos de menor tamaño y a aminoácidos libres (Kunji y col., 1996; 1998; Savijoki y col., 2006). La realización de estudios genómicos comparativos entre las BAL ha revelado diferencias en sus sistemas proteolíticos, lo que reflejaría su adaptación a la variedad de nichos ecológicos colonizados por ellas (Boekhorst y col., 2003; Klaenhammer y col., 2005). Así, mientras muchas BAL poseen proteinasas ligadas a la pared celular, otras carecen de ellas y dependen de otras BAL proteolíticas para obtener los péptidos y aminoácidos necesarios para su desarrollo.

2.5.4.1. Proteinasas

Como se ha mencionado previamente, la hidrólisis de las caseínas para su aprovechamiento por las BAL está marcada por la actividad de las proteinasas asociadas a su pared celular (PPCs). Dichas proteínas incluyen los siguientes dominios funcionales ordenados desde su extremo N-terminal hacia el C-terminal (**Fig. 2.11**): (i) una región denominada preprodominio (PP) constituida por un péptido señal de unos 40 aminoácidos necesario para la secreción y una prosequencia de unos 150 aminoácidos que se elimina mediante procesamiento autocatalítico; (ii) un dominio serina proteasa (PR) de unos 500 aminoácidos con función catalítica; (iii) un dominio de inserción (I) de unos 150 aminoácidos que modula la especificidad por el sustrato; (iv) un dominio A de unos 400 aminoácidos de función desconocida; (v) un dominio B de unos 500 aminoácidos posiblemente relacionado con la estabilidad de las PPCs; (vi) un dominio hélice (H) de unos 200 aminoácidos relacionado con el posicionamiento de los dominios A y B en el exterior de la pared celular; (vii) un dominio hidrofóbico (W) de unos 100 aminoácidos; y (viii) un dominio de anclaje a la pared celular (AN) (Siezen, 1999; Fernández-Esplá y col., 2000). Una vez secretada y procesada, la pro-proteína queda anclada a la membrana plasmática por su extremo C-terminal activándose tras la hidrólisis de la pro-secuencia. La enzima madura es una proteína monomérica del tipo serina proteasa con una masa molecular aproximada de 200 kDa.

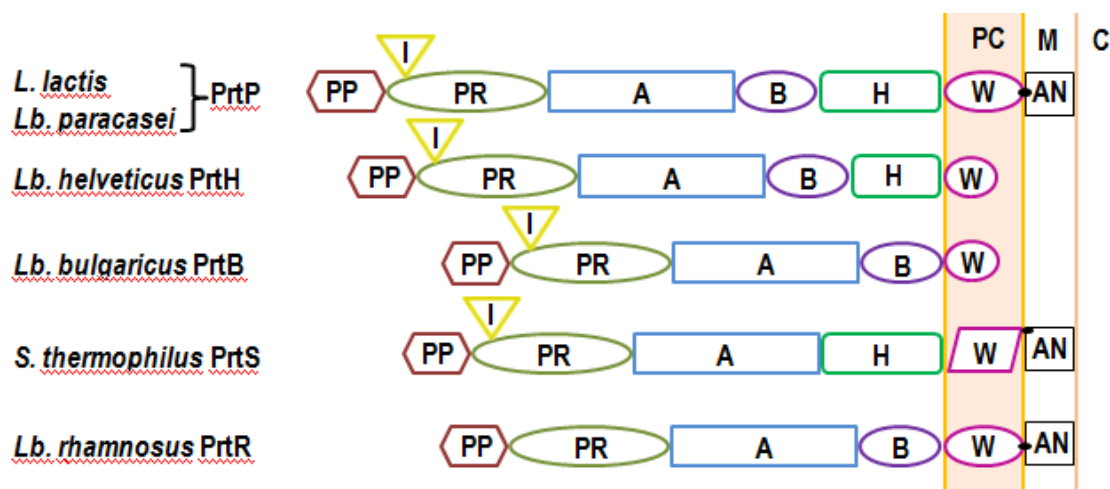


Fig. 2.11. Representación esquemática de proteinasas asociadas a la pared celular (PPCs) de distintas BAL. PC, M y C representan la pared celular, la membrana plasmática y el citoplasma, respectivamente. El resto de abreviaturas se explican en el texto. Adaptado de Siezen (1999).

Hasta la fecha se han caracterizado cinco tipos diferentes de proteinasas asociadas a la pared celular (PPCs) procedentes de *L. lactis* y *Lb. paracasei* (PrtP), *Lb. helveticus* (PrtH), *Lb. rhamnosus* (PrtR), *S. thermophilus* (PrtS) y *Lb. bulgaricus* (PrtB) (Kok y col., 1988; Holk y Naes, 1992; Gilbert y col., 1996; Penderson y col., 1999; Fernández-Esplá y col., 2000; Pastar y col., 2003). Aunque generalmente las BAL poseen un solo tipo de PPCs se han identificado cepas de *Lb. helveticus* y *Lb. bulgaricus* con más de una proteínasa (Smeianov y col., 2007; Sadat-Mekmene y col., 2011). Las PPCs muestran gran afinidad por sustratos hidrofóbicos como las caseínas que, por su alto contenido en prolina, ofrecen una estructura abierta susceptible a su actividad. En función de su actividad y especificidad por las caseínas las PPCs de las BAL se clasifican en los siguientes tipos: (i) Tipo P_I que actúa principalmente sobre la β -CN; (ii) Tipo P_{III} que actúa sobre la α_{S1} -CN, β -CN y κ -CN; y (iii) Tipo P_I / P_{III} con actividad intermedia, es decir, cuya especificidad por el sustrato es una combinación de la de los tipos anteriores (Kunji y col., 1996). A su vez, las de *L. lactis* se clasifican en siete grupos (a, b, c, d, e, f y g) en función de su especificidad por la secuencia aminoacídica de la α_{S1} -CN f(1-23) (Kunji y col., 1996).

2.5.4.2. Sistemas específicos de transporte de péptidos

Las PPCs dan lugar a la formación de diferentes oligopéptidos, sobre todo, de entre 4-8 residuos que se transportan al interior celular para ser degradados a aminoácidos libres (Juillard y col., 1995). El sistema proteolítico del género *Lactococcus*, que constituye el mejor evaluado de las BAL (Tynkkynen y col., 1993; Kunji y col., 1996; Siezen, 1999) ha permitido determinar la existencia de diferentes sistemas de transporte de di-, tri- y otros oligopéptidos al interior celular: (i) sistemas de transporte de aminoácidos específicos frente a aminoácidos estructuralmente muy similares que utilizan la hidrólisis del ATP como fuente de energía, la fuerza motriz de protones o un gradiente de concentración (Ganesan y Weimer, 2007); (ii) un sistema de transporte de di- y tripéptidos hidrofílicos (DtpT) que actúa bajo la fuerza motriz de protones (Hagting y col., 1994); (iii) un sistema de transporte de di- y tripéptidos hidrofóbicos (Dpp) que requiere la hidrólisis de ATP (Foucaud y col., 1995); y (iv) un sistema de transporte de

oligopéptidos que utiliza la hidrólisis del ATP y está formado por cinco tipos de proteínas: una proteína de unión a los péptidos que van a ser transportados (OppA), dos proteínas integradas en la membrana (OppB y OppC) y dos proteínas del tipo ABC (del inglés *ATP Binding Cassette*) (OppD y OppF) (Doeven y col., 2005).

2.5.4.3. Peptidasas

Una vez que los péptidos derivados de las caseínas se han transportado al interior celular, éstos son degradados por la acción coordinada y concertada de varias peptidasas con especificidades diferentes pero que, en muchos casos, se solapan (Kunji y col., 1996; Law y Haandrikman, 1997; Christensen y col., 1999; Siezen y col., 2002). Estas enzimas pueden dividirse en función de su mecanismo de acción, en: (i) endopeptidasas (PepO, PepE y PepF); (ii) aminopeptidasas (PepN, PepC, PepA y PepL); (iii) carboxipeptidasas, di- y tripeptidasas (PepV y PepT); y (iv) peptidasas específicas de prolina (PepX, Pepl, PepP, PepQ y PepR).

La **Fig. 2.12** muestra de forma esquemática el modo de acción de las proteinasas, sistemas específicos de transporte de péptidos y de las peptidasas descritas en la degradación de las caseínas por las BAL.

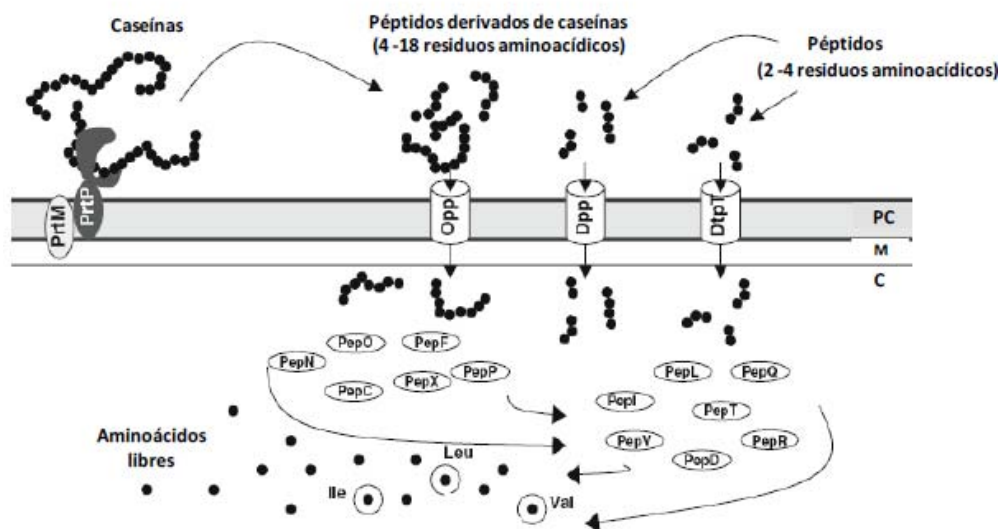


Fig. 2.12. Representación esquemática del modo de acción del sistema proteolítico de los lactococos en las caseínas. PC, M y C representan la pared celular, la membrana plasmática y el citoplasma, respectivamente. PrtM, proteína responsable de la maduración de PrtP; PrtP, proteinasa de la pared celular. Sistemas de transporte peptídico: Opp, transportador de oligopéptidos; DtpT, transportador de di- y tripeptidos hidrofílicos; Dpp, sistema de transporte de di- y tripeptidos hidrofóbicos. Peptidasas intracelulares: endopeptidasas PepO y PepF; aminopeptidasas generales PepN y PepC; aminopeptidasas específicas PepX, PepP y PepL, iminopeptidasa Pepl, tripeptidasa PepT, prolidasa PepQ, dipeptidasas PepD y PepV y prolina PepR. Adaptado de Savijoki y col. (2006).

2.5.4.4. Regulación del sistema proteolítico de las bacterias lácticas

La expresión de varios de los componentes del sistema proteolítico de *L. lactis* se encuentra regulada negativamente por el regulador transcripcional CodY. Esta proteína reguladora controla la mayor parte de los genes implicados en la asimilación de péptidos, incluyendo su transporte y la hidrólisis por peptidasas (Guédon y col., 2001), así como la expresión de algunos transportadores de aminoácidos. La intensidad de la represión transcripcional mediada por CodY está modulada por la concentración intracelular de aminoácidos de cadena ramificada como isoleucina (I), leucina (L) y valina (V). Mediante el uso de estos aminoácidos como cofactores CodY reprime la expresión de los genes del sistema proteolítico de *L. lactis* (Petranovic y col., 2004; Sonenshein, 2005). Diversos estudios han confirmado que la isoleucina a altas concentraciones es el efector más importante de entre todos los aminoácidos de cadena ramificada en la activación de CodY (Shivers y Sonenshein, 2004; Guédon y col., 2005; den Hengst y col., 2005a). Los genes potencialmente regulables por CodY poseen en la posición -35 de su promotor una secuencia palindrómica de 15 nucleótidos (AATTTTCNGAAAATT) por la que CodY manifiesta una elevada afinidad. A este respecto, se ha demostrado que la presencia de la denominada “caja CodY” es suficiente para provocar una regulación mediada por esta proteína *in vivo*. También se ha identificado esta secuencia palindrómica en la región promotora del propio gen *codY*, lo que sugiere que CodY regula su propia síntesis y requiere de una caja CodY y aminoácidos de cadena ramificada para interactuar con su promotor (Den Hengst y col., 2005b; Guédon y col. (2005). En definitiva, la existencia de este sistema de regulación implica que, en medios ricos en nitrógeno, el sistema proteolítico de *L. lactis* se encuentra reprimido por CodY hasta que la presencia de concentraciones limitantes de aminoácidos de cadena ramificada mitiga este efecto (Guédon y col., 2001; den Hengst y col., 2005a).

2.5.5. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS POR BACTERIAS LÁCTICAS

Las BAL constituyen una buena elección para la producción heteróloga de péptidos y proteínas ya que en su mayoría se consideran seguras (GRAS/QPS) y, por ello, apropiadas para la síntesis de péptidos y proteínas de interés en la industria alimentaria. En este sentido, destaca la utilización de cepas de *L. lactis* de origen lácteo cuya fisiología se ha estudiado en profundidad y para las que se dispone de la secuencia completa de su genoma y de una amplia variedad de herramientas genéticas (de Vos, 1999; Koning y col., 2000). Asimismo, su utilización se encuentra favorecida por su baja actividad proteolítica, la ausencia de plásmidos y la secreción de un número de proteínas reducido, entre las que destaca la proteína Usp45 (del inglés *Unknown secretory protein of 45 kDa*) (Johansen, 2003; Nouaille y col., 2003; le Loir y col., 2005).

La producción heteróloga de péptidos y proteínas por BAL se basa en el empleo de vectores de expresión con promotores constitutivos o inducibles. En general, los sistemas constitutivos se emplean cuando se requiere una producción constante de la sustancia de interés mientras los sistemas inducibles se utilizan cuando el objetivo es la producción de un determinado péptido o proteína a concentraciones elevadas. A pesar de la existencia en las BAL de genes con promotores constitutivos (Van der Vossen y col., 1987; Rud y col., 2006), para la producción

heteróloga de péptidos proteínas en la mayoría de los casos se utilizan sistemas inducibles, ya que permiten niveles de producción superiores a los del mejor promotor constitutivo (Gutiérrez y col., 2006; Diep y col., 2009). En este sentido, el reconocimiento de la existencia de promotores fuertemente regulados que dirigen la expresión de genes implicados en la producción de lantibióticos en lactococos y de bacteriocinas no-modificadas ha permitido el desarrollo de sistemas de expresión génica fuertemente regulados para su uso por las BAL (Mierau y Kleerebezem 2005; Diep y col., 2009). En este contexto, Kuipers y col. (1995) desarrollaron uno de los sistemas de expresión génica más exitoso y útil para su utilización por bacterias Gram-positivas, incluidas las BAL, denominado sistema NICE (del inglés *Nisin-Controlled gene Expression system*). Este sistema se basa en la utilización de: (i) una cepa que contenga los genes *nisRK* del operón de la nisina A (NisA); (ii) un vector que contenga el promotor de la NisA (*PnisA*); y (iii) el empleo de NisA como inductor de la expresión génica. El hospedador y el vector de expresión más utilizados en este sistema son la cepa de *L. lactis* subesp. *cremoris* NZ9000 (que contiene los genes *nisK* y *nisR* integrados en su cromosoma) y el plásmido pNZ8048, respectivamente. En lo que se refiere a la función inductora de la NisA, su adición al medio de cultivo se traduce en la autofosforilación de la proteína NisK que, a su vez, transfiere un grupo fosfato a la proteína NisR que inicia la transcripción de los genes localizados bajo el control del *PnisA* (de Ruyter y col., 1996; Mierau and Kleerebezem 2005). El empleo de dos vectores de expresión, uno en el que el gen de interés se encuentra bajo el control del *PnisA* y, otro, que contiene los genes reguladores *nisK* y *nisR* posibilita la utilización del sistema NICE en otras BAL que no posean los genes *nisKR* en su genoma. Para facilitar el uso del sistema de expresión NICE en BAL de diversos géneros y especies se han desarrollado vectores de expresión como el plásmido pMSP3545 que incorporan el *PnisA* y los genes *nisKR* en el mismo vector (Bryan y col., 2000; Mierau and Kleerebezem, 2005).

Por otra parte, otro factor a considerar en la producción heteróloga de péptidos y proteínas es la de su localización intracelular o extracelular. En este sentido, la secreción de péptidos y proteínas recombinantes en el medio de cultivo reduce el coste económico y el tiempo y esfuerzo derivados de su purificación, por lo que este sistema es el preferido para la utilización de las BAL como factorías celulares de producción de péptidos o proteínas o de otros compuestos de interés (Brockmeier y col., 2006; Mathiesen y col., 2008). No obstante, a pesar de los muchos estudios realizados sigue siendo difícil predecir la eficacia de producción de los péptidos y proteínas recombinantes utilizando microorganismos genéticamente modificados, así como predecir su actividad funcional (Brockmeier y col., 2006; Diep y col., 2009).

Finalmente, conviene señalar que aunque la mayoría de los vectores de expresión proteica poseen como marcadores de selección genes de resistencia a antibióticos, existen vectores equipados con sistemas de selección alternativos. Así, se han desarrollado vectores que permiten la selección de los microorganismos recombinantes mediante la complementación de mutaciones en fenotipos auxótrofos para el metabolismo de determinados carbohidratos o para la síntesis del ADN o los que se basan en su resistencia a bacteriocinas o metales (Takala y Saris, 2002; Liu y col., 2005; Sridhar y col., 2006). También se han desarrollado vectores de expresión proteica de grado alimentario para su integración directa en el genoma de las BAL mediante estrategias de recombinación genética (Leenhouts y col., 1998; Henrich y col., 2002; Simoes-Barbosa y col., 2004) lo que evita la introducción de genes de resistencia a antibióticos o

secuencias plasmídicas indeseadas, así como posibles inestabilidades estructurales o variación en el número de copias de los plásmidos.

2.6. EL GÉNERO *Enterococcus*

2.6.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y CONSIDERACIONES TAXONÓMICAS

Hasta la década de los 80 los enterococos estaban incluidos dentro del género *Streptococcus*. Sin embargo, los resultados de los estudios de hibridación de DNA-DNA y DNA/RNA realizados por Schleifer y Kilpper Bälz (1984) determinaron que *S. faecalis* y *S. faecium* debían transferirse a un género diferente, modificando sustancialmente la taxonomía de este género. Así, las especies patógenas de estreptococos se mantuvieron dentro del género *Streptococcus sensu stricto* separándolas de otras especies de interés en la industria alimentaria como *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* y *L. lactis* subesp. *cremoris*, que se agruparon en el nuevo género *Lactococcus*. Asimismo, los estreptococos fecales aislados del tracto gastrointestinal de personas y animales, de alimentos fermentados y de otros nichos ecológicos constituyeron el nuevo género *Enterococcus* (Franz y col., 2003).

Filogenéticamente, el género *Enterococcus* pertenece al grupo clostridial de las eubacterias Gram-positivas junto con otras BAL de los géneros *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*. De los citados, los géneros *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus* son los filogenéticamente más cercanos a los enterococos (Franz y col., 1999). El género *Enterococcus* engloba microorganismos Gram-positivos de morfología cocoide, catalasa y oxidasa negativos, inmóviles, anaerobios facultativos y no formadores de esporas ni cápsulas. Igualmente, los enterococos se diferencian de otros géneros como *Streptococcus* y *Lactococcus* por desarrollarse entre 10 y 45 °C, en caldo de cultivo con un 6,5% (p/v) de cloruro sódico, en un rango de pH entre 4,6 y 9,6-10, en presencia de un 40% de sales biliares, en medios con un 0,04% (p/v) de azida de sodio, y por sobrevivir a temperaturas de 60 °C durante 30 minutos (Franz y col., 2003; Martínez, 2003). Por otra parte, los enterococos producen L(+)-ácido láctico derivado del metabolismo homofermentativo de la glucosa y obtienen energía de la degradación de ciertos aminoácidos (Stiles y Holzapfel, 1997). En lo que respecta a su contenido de G+C, todas las especies del género lo presentan en una relación de 38–41 mol% (Mundt, 1986; Devriese y Pot, 1995). El desarrollo y empleo de técnicas de hibridación del ADN y ARN han permitido la clasificación del género *Enterococcus* en 44 especies, la mayoría de los cuales se engloban en seis grupos diferentes (Devriese y Pot, 1995; Franz y col., 2003; Klein, 2003; Foulquié-Moreno y col., 2006; Köhler, 2007; Franz y col., 2011) como se muestra en la **Tabla 2.8**.

Tabla 2.8. Especies incluidas en el género *Enterococcus*.

Grupo	Especie
Grupo <i>avium</i>	<i>E. avium</i> (antes <i>Streptococcus avium</i>), <i>E. pseudoavium</i> , <i>E. malodoratus</i> (antes <i>S. faecalis</i> subesp. <i>malodoratus</i>), <i>E. raffinosus</i> , <i>E. gilvus</i> , <i>E. pallens</i> , <i>E. hermannienseis</i> y <i>E. devriesei</i>
Grupo <i>cecorum</i>	<i>E. cecorum</i> (antes <i>S. cecorum</i>) y <i>E. columbae</i>
Grupo <i>faecalis</i>	<i>E. faecalis</i> (antes <i>Streptococcus faecalis</i>), <i>E. haemoperoxidus</i> , <i>E. moraviensis</i> , <i>E. silesiacus</i> , <i>E. termitis</i> , <i>E. caccae</i> , <i>E. ureasiticus</i> y <i>E. quebecensis</i>
Grupo <i>faecium</i>	<i>E. faecium</i> (antes <i>S. faecium</i>), <i>E. durans</i> (antes <i>S. durans</i>), <i>E. hirae</i> , <i>E. mundtii</i> , <i>E. villorum</i> , <i>E. canis</i> , <i>E. ratti</i> , <i>E. asini</i> , <i>E. phoniculicola</i> , <i>E. thailandicus</i> y <i>E. canintestini</i>
Grupo <i>gallinarum</i>	<i>E. gallinarum</i> (antes <i>S. gallinarum</i>) y <i>E. casseliflavus</i> (antes <i>S. casseliflavus</i>)
Grupo <i>saccharolyticus</i>	<i>E. saccharolyticus</i> , <i>E. sulfureus</i> , <i>E. aquimarinus</i> y <i>E. camelliae</i>
No agrupados	<i>E. dispar</i> , <i>E. lactis</i> , <i>E. plantarum</i> , <i>E. rivorum</i> , y <i>E. viikkiensis</i>
Taxonomía modificada	<i>E. solitarius</i> (actual <i>Tetragenococcus solitarius</i>), <i>E. seriolicida</i> (actual <i>Lactococcus garviae</i>), <i>E. porcinus</i> (sinónimo heterotípico de <i>E. villorum</i>), <i>E. flavescens</i> (sinónimo heterotípico de <i>E. casseliflavus</i>) y <i>E. saccharominimus</i> (sinónimo heterotípico de <i>E. italicus</i>)

Adaptado de Euzéby (1997). Última actualización: 2 de noviembre de 2012).

No obstante, conviene mencionar que algunas especies del género *Enterococcus* no manifiestan todas las características diferenciales mencionadas. Así por ejemplo, *E. dispar* y *E. sulfureus* no se desarrollan a 45 °C, mientras *E. cecorum* y *E. columbae* no lo hacen a 10 °C y éstas últimas, además de *E. avium* y de especies relacionadas, se desarrollan muy lentamente en presencia de 6,5% de cloruro sódico. Por lo que respecta a las pruebas serológicas *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. dispar*, *E. pseudoavium*, *E. sulfureus* y *E. saccharolyticus* no tienen el antígeno D de Lancefield como el resto de enterococos. Finalmente, *E. gallinarum* y *E. casseliflavus* muestran cierta movilidad (Casaus, 1998; Domig y col., 2003; Franz y col., 2003; Foulquié-Moreno y col., 2006; Ogier y Serror, 2008). En cualquier caso, no parece existir una característica de entre las mencionadas que sea exclusiva de este género existiendo cepas de otros géneros cercanos como, por ejemplo, *Streptococcus* y *Lactococcus* que exhiben una o más de las características típicas del género *Enterococcus* (Ruoff, 1990).

Los enterococos se aíslan de muchos ecosistemas debido a su capacidad para desarrollarse y sobrevivir en una gran variedad de condiciones. Así, se encuentran habitualmente en el suelo, alimentos, agua y plantas además de constituir una parte importante de la microbiota gastrointestinal del hombre y los animales (Murray, 1990; Franz y col., 1999; Kayser, 2003; Abriouel y col., 2008). Hasta ahora las especies del género *Enterococcus* aisladas con mayor frecuencia de la especie humana son *E. faecalis* y *E. faecium*; si bien su incidencia parece estar influenciada por factores como la edad y dieta del hospedador. Por otra parte, *E. faecium*, *E.*

faecalis, *E. durans*, *E. hirae* y *E. cecorum* son los que más frecuentemente se aíslan del tracto gastrointestinal de los animales de explotación (Devriese y col., 1991, 1994; Leclercq y col., 1996). Debido a su adaptabilidad, los enterococos del tracto gastrointestinal y del medio ambiente pueden contaminar y colonizar alimentos crudos (por ej.: carne, leche y vegetales) y desarrollarse en ellos durante su fermentación (Giraffa, 2003). Por consiguiente los enterococos y, principalmente, *E. faecium* se han aislado de una gran variedad de alimentos como: (i) leche y productos lácteos fermentados (Citti, 2005; Foulquié-Moreno y col., 2006; Fracalanza y col., 2007; Giannino y col., 2009); (ii) carne, embutidos crudos curados y carnes envasadas y tratadas térmicamente (Casaus, 1998; Martín y col., 2006; Sánchez y col., 2007; Barbosa y col., 2010); (iii) vegetales, productos vegetales fermentados y ensilados (Ohmomo y col., 2000; Sparo y col., 2006); (iv) aceitunas y encurtidos (Franz y col., 1996; Todorov y Dicks, 2005; Foulquié-Moreno y col., 2006); y (v) pescado y otros productos de la pesca, así como sus productos derivados (Ben Embarek y col., 1994; Campos y col., 2006; Muñoz-Atienza y col., 2011). Por otra parte, los enterococos también se consideran microorganismos indicadores de contaminación fecal, alterantes de los alimentos y productores de aminas biógenas (Bover-Cid y col., 2001; Sarantinopoulos y col., 2001; Franz y col., 2011; Muñoz-Atienza y col., 2011).

2.6.2. LOS ENTEROCOCOS COMO MICROORGANISMOS PATÓGENOS

A pesar de la existencia de cepas de enterococos probióticos con un largo historial de uso sin incidencias y beneficiosas para la salud durante los últimos años la seguridad de los enterococos ha sido objeto de debate lo que hace que, actualmente, los enterococos se consideren microorganismos oportunistas a cuyo potencial patógeno contribuyen: (i) la presencia en algunas cepas de genes que codifican factores potenciales de virulencia (Eaton y Gasson, 2001; Martín y col., 2006; Sánchez y col., 2007) o de resistencia a antibióticos (Shankar y col., 2002; Klare y col., 2003; Ogier y Serror, 2008); (ii) la eficacia de estos microorganismos para adquirir y compartir material genético asociado a una mayor virulencia y/o a multirresistencias tanto con cepas de la misma especie como con otras del mismo género e, incluso, con otros géneros bacterianos (Lepage y col., 2006; Aakra y col., 2007; McBride y col., 2007; Solheim y col., 2011); y (iii) su tolerancia a la acción antibacteriana de los detergentes y antisépticos de uso hospitalario, factor de importancia considerando que la mayoría de las infecciones producidas por enterococos son de carácter nosocomial (Fraise, 2002).

Los enterococos codifican diversos factores de virulencia cuya presencia se ha descrito tanto en aislados de personas, siendo más frecuentes en los de origen clínico que en los de individuos sanos como, con menor frecuencia, en aislados de alimentos e, incluso, en cepas empleadas como cultivos iniciadores en la industria alimentaria (Eaton y Gasson, 2001; Franz y col., 2003; Ogier y Serror, 2008; Franz y col., 2011). Cepas de *E. faecalis* y, en menor proporción, de *E. faecium* se han aislado de bacteremias, infecciones del tracto genitourinario, endocarditis y de otras afecciones tanto de personas como animales (MacEachern y col., 2005; Ogier y Serror, 2008; Arias y Murray, 2012). Igualmente, otros enterococos como *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. hirae* y *E. mundtii* se han asociado a endoftalmis y endocarditis en personas (Dargere y col., 2002; Poyart y col., 2002; Stepanovic y col., 2004; Higashide y col., 2005). No obstante, los enterococos no son tan virulentos como otras bacterias patógenas Gram-positivas y,

generalmente, son necesarias alteraciones del sistema inmune del hospedador para originar infecciones. Además, en la mayor parte de los casos los enterococos se encuentran formando parte de cultivos mixtos en pacientes con enfermedades subyacentes severas y, sólo en algunas ocasiones, se han identificado como los únicos agentes responsables de bacteriemias o endocarditis en pacientes inmunodeprimidos. Por tanto, un prerequisite para que los enterococos originen infecciones es la existencia de deficiencias en los mecanismos de defensa del hospedador (Morrison y col., 1997; Kayser, 2003). Asimismo, las infecciones por enterococos suelen producirse en ambientes hospitalarios de manera que, según datos epidemiológicos recientes, estos microorganismos constituyen la tercera causa más común de infecciones nosocomiales en los Estados Unidos (Wisplinghoff y col., 2004) y la cuarta en Europa (<http://www.earss.rivm.nl/>).

Las cepas virulentas de enterococos poseen genes asociados a su virulencia y a la resistencia a antibióticos procedentes de la adquisición de elementos genéticos móviles como transposones, bacteriófagos e islas de patogenicidad (Franz y col., 2011; Willems y col., 2011). La adquisición de material genético para su adaptación al hospedador humano posiblemente también ha influido en el desarrollo de linajes genéticos en los que convergen la producción de factores potenciales de virulencia y de resistencia a antibióticos (Lepage y col., 2006). Algunos de estos linajes genéticos, llamados complejos clonales (CC), están constituidos por cepas de origen clínico o adaptadas al ambiente hospitalario. En este sentido, la utilización de la técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST²) para el tipado molecular de *E. faecalis* y *E. faecium* ha permitido identificar la dispersión en Europa y América de dos complejos clonales de *E. faecalis* de alto riesgo adaptados al medio hospitalario, denominados CC2 y CC9, que incluyen cepas resistentes a la vancomicina y responsables de infecciones nosocomiales (Ruiz-Garbajosa y col., 2006; Ruiz-Garbajosa, 2007). Otro linaje genético problemático por su patogenicidad extendido por todo el mundo y adaptado a los ambientes hospitalarios es el CC17 de *E. faecium*, el cual contiene una isla de patogenicidad que codifica factores potenciales de virulencia y de resistencia a la vancomicina (Leavis y col., 2004; Nallapareddy y col., 2008; van Schaik y col., 2010). La identificación de tres aislados de *E. faecium* pertenecientes al CC17 y, aislados de alimentos, sugiere que este CC no se encuentra exclusivamente asociado a los enterococos de ambientes hospitalarios (López y col., 2009) y sugiere que, independientemente de su origen (clínico, ambiental, alimentario) los enterococos adquieren elementos genéticos móviles asociados a su virulencia y resistencia a antibióticos. En este sentido, varios estudios relativos a la presencia de factores de virulencia en enterococos aislados de alimentos han revelado que la incidencia de dichos factores es específica de cada cepa independientemente de su origen o localización (hospedadores humanos y animales, alimentos o medio ambiente) (Aakra y col., 2007; Abriouel y col., 2008). Algunos de estos determinantes genéticos codifican proteínas

² La técnica MLST es una técnica genética para la tipificación molecular de microorganismos. La amplificación y secuenciación nucleotídica de fragmentos internos de entre 450 y 500 pares de bases de varios genes conservados, permite asignar a cada secuencia única un número de alelo. Para cada muestra la combinación de los números alélicos en cada uno de los *loci* definen el perfil alélico o tipo de secuencia (en inglés *Sequence Type*, ST). En el caso de *E. faecalis* y *E. faecium*, se han desarrollado bases de datos de MLST, específicas de estas especies, localizables en efaecalis.mlst.net y efaecium.mlst.net.

(citolisinas, adhesinas, etc.) que podrían ser responsables de funciones adaptativas no solamente en el hospedador sino también en el medio (por ej.: lisis de eritrocitos o de bacterias competidoras; adhesión a células del hospedador o a superficies abióticas; hidrólisis de componentes de tejidos del hospedador o de nutrientes poliméricos, etc.), cuya expresión podría estar regulada por mecanismos adaptativos relacionados con el origen o ecosistema en el que se desarrollan (Lepage y col., 2006; Domann y col., 2007).

De lo descrito cabe deducir que la utilización de los enterococos como cultivos iniciadores o probióticos, tanto en alimentos como en los piensos para animales requiere una evaluación detallada de los factores potenciales de virulencia de cada cepa que permita adquirir una certeza razonable de su seguridad para las personas y los animales (FAO/WHO, 2002; EFSA, 2007). A este respecto, la EFSA (2012) ha publicado una guía para evaluar la seguridad de las cepas de *E. faecium* para su empleo en nutrición animal cuyo objetivo es diferenciar las cepas de *E. faecium* de uso seguro en producción animal de las de origen clínico y, posiblemente, responsables de infecciones en las personas. La diferenciación se basa en la susceptibilidad de las cepas de *E. faecium* a la ampicilina y a la ausencia de tres marcadores genéticos frecuentemente asociados a los enterococos de origen clínico: (i) el elemento genético móvil IS16 (Werner y col., 2011); (ii) el gen *esp* asociado a una isla de patogenicidad que codifica una proteína de superficie de los enterococos denominada Esp (**sección 2.6.2.2.2.**); y (iii) el gen *hyl* que codifica una proteína inicialmente descrita como una hialuronidasa pero, recientemente, anotada como una hipotética glicosil hidrolasa que podría facilitar la colonización intestinal de las personas y animales por este microorganismo (Freitas y col., 2010). Según esta guía, ninguna cepa de *E. faecium* resistente a la ampicilina a concentraciones mayores de 2 mg/mL o que posea alguno de los tres marcadores genéticos de virulencia previamente mencionados debería emplearse como aditivo en alimentación animal.

2.6.2.1. Resistencia a antibióticos

Además de su considerable resistencia a factores físico-químicos y condiciones ambientales adversas los enterococos y, principalmente, *E. faecium* poseen un amplio espectro de resistencias naturales (intrínsecas) y adquiridas (transferibles) a antibióticos (Eaton y Gasson, 2001; Klare y col., 2001, 2003; Ogier y Serror, 2008), lo que constituye uno de los factores que determinan su supervivencia en el ambiente hospitalario. En lo que se refiere a su resistencia intrínseca, los enterococos son resistentes a las penicilinas semisintéticas resistentes a β -lactamasa, ácido nalidíxico, bajos niveles de aminoglucósidos, cefalosporinas, estreptograminas (exclusivamente *E. faecalis*), fluoroquinolonas, bajos niveles de glicopéptidos (exclusivamente *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y *E. flavescens*) y a los bajos niveles de lincosamidas, monobactams, polimixinas y sulfonamidas. Por otra parte, los enterococos pueden adquirir resistencia a diversos antibióticos como β -lactámicos, ácido fusídico, niveles altos de aminoglucósidos, cloranfenicol, estreptograminas, glicopéptidos, lincosamidas, macrólidos, nitrofurantoína, oxazolidinonas, quinolonas, rifampicina, tetraciclinas y trimetoprim (Witte y col., 1999; Klare y col., 2001, 2003; Marothi y col., 2005). Los mecanismos de resistencia adquirida a antibióticos se deben a la acumulación de mutaciones en genes cromosómicos y a la adquisición de genes de resistencia mediante su transferencia conjugativa desde las cepas donadoras.

Ambos procesos son consecuencia de la intensa presión selectiva derivada del empleo de antibióticos tanto en medicina humana y veterinaria, como en la producción animal (Klare y col., 2001, 2003). En particular, los enterococos resistentes a la vancomicina, principalmente *E. faecium*, constituyen un problema grave en los hospitales de todo el mundo (Willems et al., 2001; Ruiz-Garbajosa y col., 2006; Werner y col., 2008).

Por otra parte, aunque la presencia en los alimentos de enterococos resistentes a antibióticos es relativamente frecuente, su resistencia a los antibióticos de relevancia clínica como la ampicilina, gentamicina, penicilina o vancomicina es rara siendo, generalmente, su sensibilidad a los antibióticos significativamente mayor que la de las cepas de origen clínico (Eaton y Gasson, 2001; de Vuyst y col., 2003; Mannu y col., 2003; Ben Omar y col., 2004; Foulquié-Moreno y col., 2006; McGowan y col., 2006; Hummel y col., 2007; Ogier y Serror, 2008). En este sentido, Eaton y Gasson (2001) identificaron genes que codifican factores potenciales de virulencia y de resistencia a antibióticos en *E. faecalis* de origen alimentario y demostraron la capacidad de los enterococos empleados como cultivos iniciadores de adquirir los plásmidos en los que se encuentran estos genes por conjugación, aunque con frecuencias de transferencia menores que en las cepas de origen clínico. También se ha demostrado que durante la elaboración de quesos y embutidos crudos curados, los genes que codifican posibles factores de virulencia y de resistencia a antibióticos en plásmidos conjugativos se transfieren, naturalmente y con elevada frecuencia, entre los enterococos (Cocconcelli y col., 2003).

Dentro de las BAL la presencia de plásmidos con genes de resistencia a antibióticos no es exclusiva de los enterococos sino que, también es relativamente común en los lactococos, leuconostocs, pediococos y lactobacilos detectándose también la presencia de dichos plásmidos en otros microorganismos considerados seguros como las bifidobacterias (Dellaglio y col., 1995; Devriese y Pot, 1995; Sgorbati y col., 1995; Simpson y Taguchi, 1995; Teuber, 1995). Igualmente, puesto que se ha demostrado que los plásmidos conjugativos con resistencias a antibióticos, como los plásmidos pAMB1 y PIP501, se transfieren entre BAL de diversos géneros (Mathur y Singh; 2005), podría concluirse que no existen barreras para la transferencia de las resistencias a antibióticos entre bacterias patógenas (*i.e.* estreptococos), potencialmente patógenas (*i.e.* enterococos) o comensales (*i.e.* lactobacilos y lactococos).

2.6.2.2. Factores de virulencia

A diferencia de lo que ocurre con otros microorganismos en los enterococos no parece existir un único factor fundamental responsable de su virulencia, sino que son varios los factores implicados en su patogénesis. La mayoría de los factores de virulencia, descritos hasta la fecha (Tabla 2.9), son productos de secreción como la citolisina y la gelatinasa o factores de adhesión como la sustancia de agregación (Agg o AS, del inglés *Aggregation Substance*) y la proteína de superficie de los enterococos (Esp, del inglés *Enterococcal Surface Protein*) (Eaton y Gasson, 2001; Ogier y Serror, 2008).

Tabla 2.9. Principales factores potenciales de virulencia del género *Enterococcus*.

Gen(es)	Proteína(s)	Funciones en la virulencia de su(s) producto(s)
<i>agg</i>	Proteína de agregación (Agg)	Adherencia a células eucariotas, agregación celular bacteriana y conjugación
<i>gelE</i>	Gelatinasa (GelE)	Hidrólisis de la gelatina, el colágeno, la hemoglobina y otros compuestos
<i>cyl_{LL}</i> - <i>cyl_{LS}</i>	Precursores de la citolisina (Cyl)	Actividad lítica sobre células eucariotas y bacterias Gram-positivas.
<i>cylM</i>	CylM	Modificación postraduccional de Cyl
<i>cylB</i>	CylB	Transporte de Cyl
<i>cylA</i>	CylA	Activación de Cyl
<i>cylI</i>	CylI	Inmunidad frente a Cyl
<i>cylR1</i> - <i>cylR2</i>	CylR1 y CylR2	Regulación de la síntesis de Cyl
<i>esp</i>	Proteína de superficie de enterococos (Esp)	Evasión de la respuesta inmune
<i>efaA_{fs}</i> - <i>efaA_{fm}</i>	Adhesinas de la pared celular EfaA _{fs} y EfaA _{fm}	Adhesión de las células de <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i> a tejidos
<i>cpd</i> , <i>cob</i> , <i>ccf</i> y <i>cad</i>	Feromonas sexuales	Implicadas en fenómenos de conjugación. Moduladoras de la respuesta inmune
<i>hyl</i>	Hipotética glicosil hidrolasa	Facilita la colonización intestinal por <i>E. faecium</i>

Adaptado de Eaton y Gasson (2001) y Sánchez (2008).

2.6.2.2.1. Sustancia de agregación

La sustancia de agregación (Agg) es una proteína de superficie de *E. faecalis* codificada por genes localizados en plásmidos conjugativos regulados por feromonas sexuales, lo que promueve la formación de agregados durante la conjugación bacteriana (Clewell, 1993). Las feromonas son péptidos hidrofóbicos de pequeño tamaño molecular cuyos genes también se encuentran localizados en plásmidos (Franz y col., 2003; Donelli y col., 2004). Durante la conjugación bacteriana en la célula donadora expuesta a feromonas se induce la síntesis de la Agg que, al unirse a un receptor de la superficie de las células receptoras, denominado sustancia de unión de enterococos (EBS, del inglés *Enterococcal Binding Substance*) promueve la agregación de las células donadoras y receptoras y la transferencia, a las últimas, del plásmido que codifica la Agg. Los plásmidos conjugativos regulados por feromonas se han descrito tanto en *E. faecalis* como *E. faecium* en los que desempeñan un papel en su virulencia. Asimismo, las feromonas sexuales originan una respuesta inflamatoria en el hospedador, inducen la secreción de peróxido de hidrógeno y enzimas de los lisosomas y son quimiotácticas para los leucocitos de personas y ratas, por lo que también podrían considerarse como factores potenciales de virulencia (Eaton y Gasson, 2001).

La proteína Agg desempeña también un papel importante en la adherencia de los enterococos a las células eucariotas mediada por la presencia, en su secuencia aminoacídica de dos motivos RGD (Arg-Gly-Asp) reconocidos por integrinas, una familia de receptores localizados en células eucariotas como leucocitos, trombocitos, macrófagos y células del epitelio intestinal (Sartingen y col., 2000; Süßmuth y col., 2002). Asimismo, esta proteína se ha relacionado con la capacidad de translocación de los enterococos a través de los tejidos del hospedador. En este sentido, se conoce que los enterococos atraviesan el epitelio intestinal o el genitourinario a través de las células epiteliales intactas, para llegar hasta el sistema linfático y/o vascular mediante un proceso de translocación no bien conocido. No obstante, cuando el epitelio intestinal se encuentra dañado los enterococos que expresan la Agg se unen con mayor afinidad a las proteínas de la matriz extracelular, lo que favorece su translocación. También se conoce que las endocarditis producidas por enterococos son más frecuentes en los casos de daño endotelial, lo que confirma el importante papel que juega en la patogénesis de estas infecciones la adherencia de los enterococos a las proteínas de la matriz extracelular (Franz y col., 2003). También se ha propuesto que la Agg favorece la supervivencia intracelular de *E. faecalis* dentro de los neutrófilos por la prevención o retraso de la formación de fagolisosomas (Kayser, 2003). Hasta la fecha, la sustancia de agregación Agg se ha detectado exclusivamente en *E. faecalis* y su presencia en aislados procedentes de alimentos es elevada (Eaton y Gasson, 2001; Franz y col., 2001).

En conclusión, la producción de la Agg favorece la adhesión y la invasión celular, la translocación de los enterococos en los tejidos del hospedador y la evasión de la respuesta inmune, constituyendo un importante factor de virulencia en la patogénesis de las infecciones producidas por los enterococos que la producen.

2.6.2.2.2. Proteína de superficie de enterococos

La proteína de superficie de enterococos (Esp) fue descrita por primera vez en *E. faecalis* MMH594, un aislado clínico resistente a la gentamicina (Shankar y col., 1999). Esta adhesina se encuentra codificada por el gen *esp*, asociado a una isla de patogenidad de 153 Kb (Shankar y col., 2002). Las islas de patogenidad, caracterizadas por poseer un contenido en G+C distinto al del ADN cromosómico, están constituidas por fragmentos génicos de gran tamaño en los que se localizan los genes que codifican transposasas, reguladores transcripcionales y factores potenciales de virulencia. La incidencia del gen *esp* en *E. faecalis* es relativamente elevada, sobre todo en los aislados de endocarditis, siendo menos frecuente en *E. faecium*. Sin embargo, en aislados clínicos de *E. faecium* también se ha descrito una variante de esta proteína, denominada Esp_{fm}, localizada en otra posible isla de patogenidad (Eaton y Gasson, 2001; Willems y col., 2001; Leavis y col., 2004).

La producción de Esp incrementa la hidrofobicidad celular, la adherencia de las células productoras a superficies abióticas y la formación de “biofilms” (Toledo-Arana y col., 2001). Los “biofilms” o películas biológicas son comunidades bacterianas unidas a un sustrato biótico o abiótico integradas en una matriz compuesta por carbohidratos, ADN, y/o proteínas (O'Toole y col., 2000; Lewis, 2001; Donlan y Costerton, 2002; Whitchur y col., 2002). Basándose en la

similitud de Esp con receptores proteicos de superficie denominados "componentes de superficie microbianos que reconocen moléculas de unión de la matriz" (MSCRAMMs, del inglés *Microbial Surface Components Recognising Adhesive Matrix Molecules*) que facilitan la unión a proteínas de la matriz extracelular, se ha sugerido la posibilidad de que esta proteína interactúe con la matriz extracelular, promoviendo así la colonización de los tejidos del hospedador. El incremento de la formación de "biofilms" asociado a la presencia de Esp tiene implicaciones obvias para pacientes con implantes médicos como catéteres venosos o urinarios, prótesis de cadera y otros dispositivos, contribuyendo al desarrollo de infecciones nosocomiales y a la patogénesis de las infecciones crónicas como las endocarditis (Donlan y col., 2002; Parsek y Singh, 2003). En este sentido, se ha demostrado que la delección del gen *esp* en *E. faecium* reduce considerablemente su capacidad para formar "biofilms" (**Fig. 2.13**) (Heikens y col., 2007). No obstante, ya que a pesar de la inactivación completa del gen *esp* por las cepas mutantes la formación de "biofilms" alcanza niveles muy bajos pero medibles, se ha sugerido la existencia de otros factores que contribuirían a la formación de los mismos. Dado que la Esp parece participar en la adhesión, colonización y propagación de los enterococos en los tejidos del hospedador, así como en su adherencia a superficies abióticas y la formación de "biofilms" esta proteína junto con otras de funciones similares, podría considerarse como diana terapéutica en el control y erradicación de infecciones ocasionadas por los enterococos que la producen.

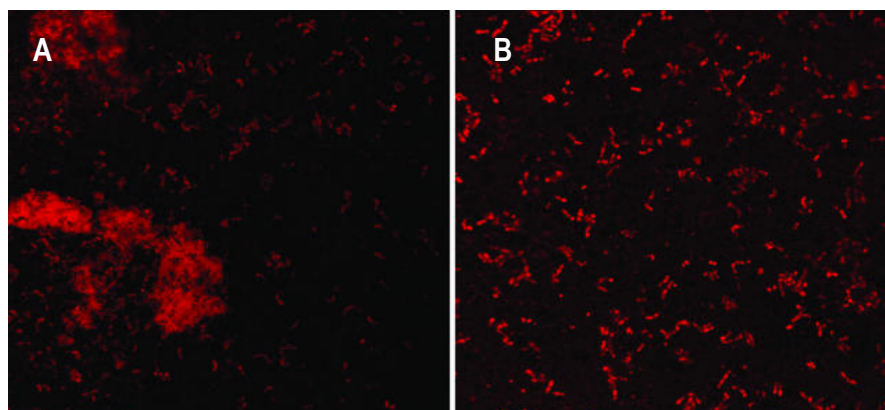


Fig. 2.13. Formación de "biofilms" en membranas de nitrocelulosa por una cepa de *E. faecium* con delección del gen *esp* (A) y por la correspondiente cepa salvaje (B). Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía confocal láser de barrido (CLSM, del inglés *Confocal Laser Scanning Microscopy*) tras la tinción de la muestra con naranja de acridina. Fuente: Heikens y col. (2007).

En definitiva, la elevada prevalencia del gen *esp* en aislados clínicos de *E. faecalis* y, en menor medida, de *E. faecium* sugiere que la Esp ejerce un papel importante en la patogénesis de las infecciones ocasionadas por ambas especies de enterococos (Eaton y Gasson, 2001, 2002; Shankar y col., 2001; Coque y col., 2002; Vergis y col., 2002; Harrington y col., 2004).

2.6.2.2.3. Adhesinas

Las adhesinas del colágeno, denominadas Ace y Acn y producidas por *E. faecalis* y *E. faecium*, respectivamente, son proteínas del grupo de los MSCRAMMs capaces de interactuar

con proteínas de la matriz extracelular como el colágeno tipo I y IV y la laminina, favoreciendo así la unión de los enterococos a las células del hospedador (Rich y col., 1999; Nallapareddy y col., 2000a, b; 2003). Puesto que la adhesina Ace se produce durante el proceso infeccioso el 90% de los sueros de pacientes con endocarditis por enterococos reaccionan con anticuerpos anti-Ace capaces de inhibir la adherencia de Ace a las proteínas de la matriz extracelular (Nallapareddy y col., 2000a).

Otras moléculas del grupo de las adhesinas y también consideradas como factores potenciales de virulencia de los enterococos son los antígenos similares a las adhesinas EfaA_{fs} y EfaA_{fm} producidos por *E. faecalis* y *E. faecium*, respectivamente. El antígeno EfaA_{fs} muestra una gran homología con adhesinas de los estreptococos como PsaA, SsaB, FimA y ScaA (Lowe y col., 1995). Hasta la fecha, la virulencia del antígeno EfaA_{fs} de *E. faecalis* sólo se ha sugerido en la patogénesis de algunas infecciones como las endocarditis en las que intervendría en la adhesión bacteriana a las células del endocardio, mientras que la función del antígeno EfaA_{fm} de *E. faecium* no se conoce todavía bien (Lowe y col., 1995; Singh y col., 1998; Franz y col., 2003; Hendrickx y col., 2009).

Por último, estudios recientes parecen confirmar que, además de las adhesinas, los filamentos o “pelos” de superficie (“pili”) de los enterococos podrían intervenir también al menos en la fase inicial de su unión a las células del hospedador (Mandlick y col., 2008).

En la **Fig. 2.14** se muestran esquemáticamente los factores de virulencia descritos en este apartado, así como la posible función desempeñada por cada uno de ellos durante la infección por enterococos.

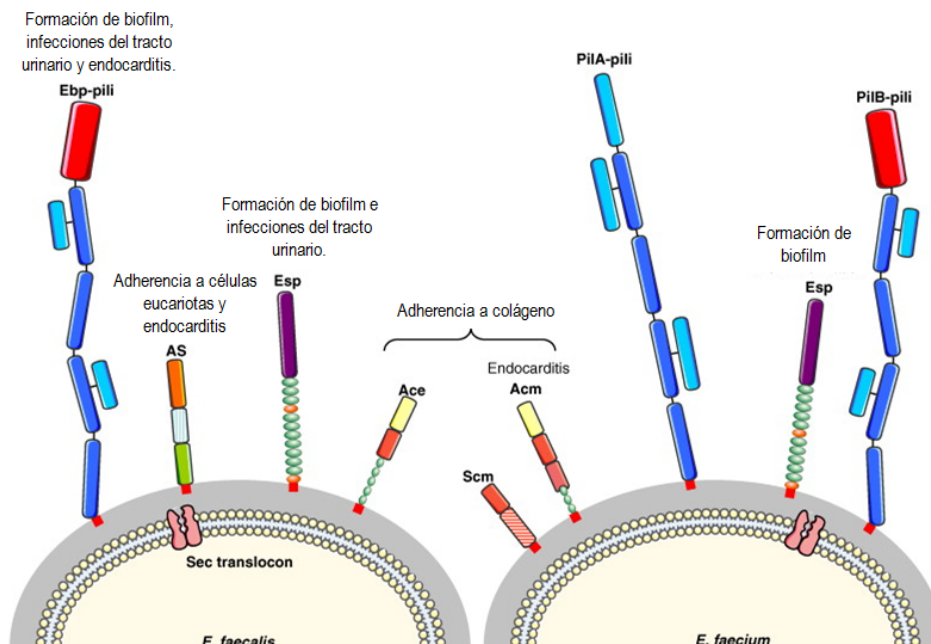


Fig. 2.14. Representación esquemática de las proteínas de superficie y de los filamentos de superficie “pili” de los enterococos e indicación de su función durante la infección de sus hospedadores. Adaptado de Hendrickx y col. (2009).

2.6.2.2.4. Citolisina o hemolisina β

Los primeros resultados sobre la producción de una citolisina por los enterococos datan de los años 40 y derivan de la observación de la inhibición del desarrollo de ciertas bacterias por estreptococos β -hemolíticos del grupo D (Sherwood y col., 1949). Hacia los años 60 se determinó que la actividad hemolítica y antagonista del desarrollo bacteriano ejercida por *E. faecalis* se debía a un único compuesto bifuncional (hemolisina/bacteriocina) al que, de forma simplificada, se denominó citolisina (Brock y Davie, 1963; Granato y Jackson, 1969; Gilmore y col., 1994). La hemolisina β o citolisina (Cyl, del inglés *Cytolysin*) es una toxina extracelular sintetizada por aislados de *E. faecalis* capaces de lisar eritrocitos y otras células eucariotas y procariotas, y con actividad antimicrobiana como una bacteriocina (Franz y col., 2003; Kayser, 2003). La producción de esta toxina requiere la expresión de ocho genes localizados en un único operón (**Fig. 2.15**) que pueden encontrarse en el cromosoma, en plásmidos conjugativos regulados por feromonas o en una isla de patogenicidad, generalmente asociados a genes que codifican otros factores de virulencia como Agg y Esp (Gilmore y col., 1994; Haas y col., 2002; Shankar y col., 2002, 2004; Coburn y col., 2007). En este operón los genes *cylL_L*, *cylL_S*, *cylM*, *cylB*, *cylA* y *cylI* se transcriben como una única unidad transcripcional mientras que los genes reguladores *cylR1* y *cylR2*, localizados en sentido opuesto a los anteriores, constituyen una unidad transcripcional independiente (Haas y col., 2002). La producción de la citolisina activa requiere la síntesis de dos precursores peptídicos, CylL_L y CylL_S (codificados por los genes *cylL_L* y *cylL_S*) modificados postraduccionalmente por la proteína CylM, dando lugar a las subunidades CylL_L^{*} y CylL_S^{*}. Posteriormente, CylB un transportador del tipo ABC se ocupa del transporte y secreción de ambas subunidades a través de la membrana celular así como de eliminar su secuencia líder, originando las subunidades CylL_L['] y CylL_S[']. A continuación, una serina proteasa, codificada por *cylA*, elimina un fragmento de seis aminoácidos del extremo N-terminal de cada una de las subunidades generando los dos péptidos activos, CylL_L^{''} y CylL_S^{''}. CylI es la proteína de inmunidad encargada de proteger a la célula productora de la actividad antimicrobiana de los péptidos activos. Finalmente, la producción y secreción de Cyl se encuentra regulada por un mecanismo dependiente de la densidad celular (sistema *quorum sensing*) en el que intervienen CylR1 y CylR2 (Franz y col., 1999; Kayser y col., 2003; Shankar y col., 2004).

Los resultados derivados de la evaluación de diversos factores de virulencia, entre los que se encuentra la citolisina, en *E. faecalis* aislados de alimentos y muestras clínicas (Semedo y col. 2003) han puesto de manifiesto que tanto el operón *cyl* como su potencial hemolítico se muestran muy activos en los aislados con una asociación significativa entre este factor de virulencia y el origen clínico de los aislados, a diferencia de lo que ocurriría con otros factores de virulencia (adhesinas de superficie, proteasas, etc.) cuya incidencia fue elevada en todos los aislados de *E. faecalis*, independientemente de su origen.

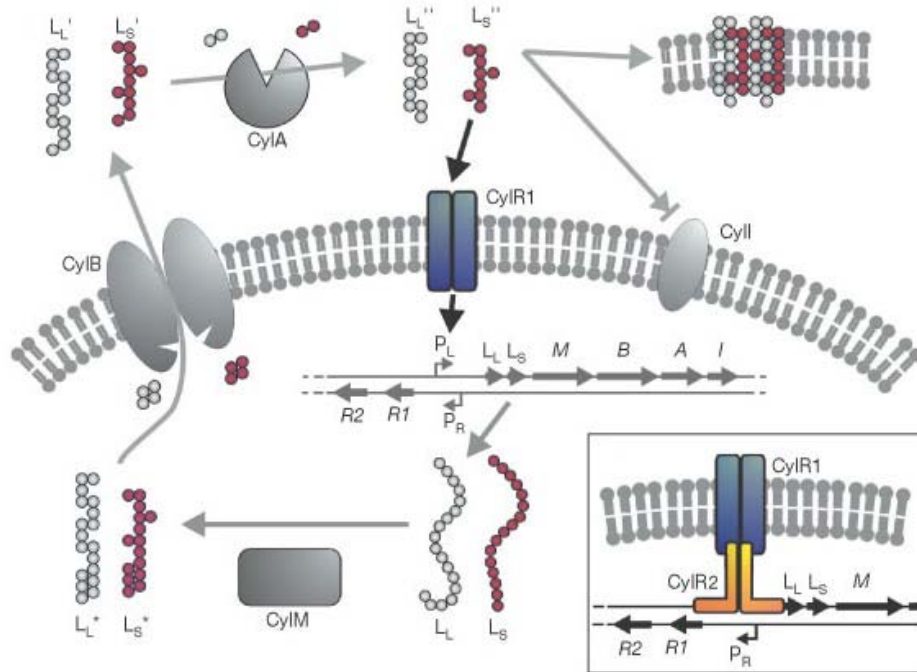


Fig. 2.15. Operón de la citolisina de *E. faecalis* y mecanismo implicado en su síntesis, transporte, maduración, inmunidad y regulación de su producción. Fuente: Haas y col. (2002).

En definitiva, la toxina Cyl es uno de los factores de virulencia más significativos de *E. faecalis* debido a su implicación en: (i) la ruptura de las membranas celulares de las bacterias Gram-positivas, eritrocitos y otras células eucariotas, (ii) el nivel de toxicidad y letalidad de las infecciones al favorecer la llegada de los enterococos al torrente sanguíneo, y (iii) la patogénesis asociada a la mortalidad en infecciones humanas (Coburn y Gilmore, 2003; Franz y col., 2003; Kayser, 2003; Coburn y col., 2004; Koch y col., 2004; Cox y col., 2005).

2.6.2.2.5. Gelatinasa y serina proteasa

La gelatinasa (GelE) es una metaloendopeptidasa extracelular de 34 KDa producida por *E. faecalis* capaz de degradar sustratos como la gelatina, los fragmentos insolubles de colágeno, la cadena β de la insulina, la hemoglobina, la endotelina-I, la fibrina polimerizada, la laminina y otras proteínas de los tejidos del hospedador, favoreciendo así la migración y difusión de *E. faecalis* por el hospedador y contribuyendo, por tanto, a su virulencia (Mäkinen y col., 1989; Waters y col., 2003; Park y col., 2007, 2008; Steck y col., 2011). Además, esta enzima también está implicada en la degradación de feromonas sexuales y de péptidos involucrados en la transferencia de plásmidos por conjugación entre diferentes cepas de *E. faecalis*, mostrando preferencia por las regiones hidrófobas de las proteínas (Mäkinen y col., 1989; Mäkinen y Mäkinen, 1994). Asimismo, al igual que otros miembros de la familia de las zinc-metaloproteasas M4 a la que pertenece esta enzima, la GelE se sintetiza en forma de zimógeno (preproenzima), sufriendo posteriormente un proceso autocatalítico de maduración con la pérdida de 192 aa de la región N-terminal de su prosequencia lo que origina la GelE madura (Su y col., 1990). Además,

se ha sugerido que la activación completa de la GelE madura podría precisar de la pérdida adicional de 14 aa de su extremo C-terminal (Del Papa y col., 2007).

El gen responsable de la síntesis de la GelE (*gelE*) se localiza en un operón en el que se encuentra el gen *sprE*, que codifica una proteasa extracelular de 26 KDa denominada serina proteasa (SprE). Esta proteasa muestra una gran homología con la proteasa V8 de *Staphylococcus aureus* y está implicada en procesos infectivos *in vitro*, aunque se desconoce el papel exacto que desempeña en el hospedador (Qin y col., 2000, 2001; Engelbert y col., 2004; Kawalec y col., 2005). A su vez, la transcripción de los genes *gelE-sprE* se encuentra regulada positivamente por el locus *fsr* (del inglés *E. faecalis* regulator) constituido por los genes *fsrA*, *fsrB*, *fsrC* y *fsrD* (Fig. 2.16) (Qin y col., 2000, 2001). El gen *fsrD* codifica un péptido cíclico autoinducible denominado GBAP (del inglés *Gelatinase-Biosynthesis-Activating-Pheromone*) que es procesado y transportado al exterior de la célula por la proteína FsrB. La acumulación de GBAP se detecta por la histidina quinasa FsrC, encargada de la activación del regulador de respuesta FsrA que, a su vez, induce la expresión de los genes *fsrABCD* (Nakayama y col., 2001a, b; Nishiguchi y col., 2009; Teixeira y col., 2012). Con respecto a la función de estos genes en la virulencia de los enterococos conviene señalar que, tanto el sistema Fsr como la GelE y SprE, contribuyen a la formación de “biofilms” y a la patogénesis en diferentes modelos de infección en animales entre los que se incluyen los de peritonitis en ratones, endoftalmitis en conejos, infecciones en el nematodo *Caenorhabditis elegans* y evasión del sistema inmune en el insecto *Galleria mellonella* (Sifri y col., 2002; Engelbert y col., 2004; Hancock y Perego, 2004; Gaspar y col., 2009). Sin embargo, dado que a pesar de la implicación de los genes *gelE-sprE* y *fsrABCD* en la virulencia de *E. faecalis*, todos ellos se identifican en enterococos de nichos ecológicos muy diversos (Eaton y Gasson, 2001; Silva-Lopes y col., 2006) y de que la virulencia de *E. faecalis* no depende exclusivamente de ambas proteasas, es posible que GelE, SprE y Fsr pudieran desempeñar un papel adicional, no relacionado con su virulencia, en la biología de *E. faecalis* (Thomas y col., 2009).

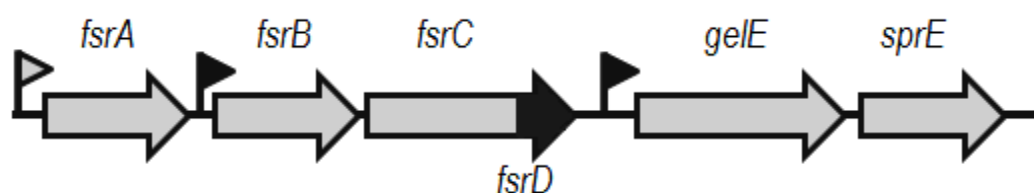


Fig. 2.16. Mapa genético de los genes *fsrABCD* y del operón *gelE-sprE*. La flecha negra se corresponde con el gen *fsrD* y las banderas grises y negras representan los promotores constitutivos e inducibles, respectivamente, por GBAP. Fuente: Nakayama y col. (2006).

2.6.4. LOS ENTEROCOCOS COMO CULTIVOS INICIADORES Y PROBIÓTICOS

Los enterococos participan en la producción de un gran número de alimentos fermentados en los que contribuyen al desarrollo de sus características organolépticas. En este sentido, el aislamiento de *E. faecium* y *E. faecalis* de diferentes tipos de quesos con buenas características acidificantes y propiedades proteolíticas (Suzzi y col., 2000), la utilización de los enterococos

como cultivos iniciadores en la elaboración de ciertos derivados lácteos y cárnicos (Hugas y col., 2003; Giraffa y col., 1997) y su contribución a la maduración, desarrollo de las características sensoriales y obtención de alimentos únicos desde un punto de vista organoléptico, han facilitado la presencia de los enterococos en los alimentos (Sarantinopoulos y col., 2001; Franz y col., 2003; Giraffa y col., 2003).

Por otra parte, a pesar de que la mayor parte de los microorganismos utilizados como probióticos en alimentación humana y animal pertenecen a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, algunas cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* también se han empleado como probióticos en alimentos, en preparaciones farmacéuticas para uso humano o animal o como aditivos en los piensos para animales (Franz y col., 1999; Foulquié-Moreno y col., 2006; Franz y col., 2011). En lo que se refiere a las preparaciones farmacéuticas las cepas más consolidadas como probióticos son las de *E. faecium* SF68 y *E. faecalis* Symbioflor 1, comercializadas por Cerbios Pharma (Suiza) y SymbioPharm (Alemania), respectivamente. En particular, la cepa de *E. faecium* SF68 posee una larga historia de empleo seguro en personas y en alimentación animal. La cepa es eficaz en el tratamiento de diarreas de etiología vírica y bacteriana y de la diarrea asociada al uso de antibióticos (DAA) tanto en niños como en adultos, disminuyendo los días de duración del proceso y el número de deposiciones del paciente, mientras su empleo se considera como una alternativa segura a la administración de antibióticos (Lewenstein y col., 1979; Bellomo y col., 1980; Franz y col., 2011). También se ha demostrado que *E. faecium* SF68 disminuye los niveles de colesterol en sangre y la incidencia de diarrea y mucositis oral en pacientes con tuberculosis pulmonar crónica. Asimismo, también se ha aconsejado su empleo para mejorar el estado mental de pacientes con encefalopatía hepática debido a su efecto en la reducción de los niveles sanguíneos de amonio (Franz y col., 1999; Foulquié-Moreno y col., 2006; Chen y col., 2010; Franz y col., 2011). Además, en el ámbito veterinario la administración de *E. faecium* SF68 se ha autorizado en perros jóvenes para estimular su respuesta inmune (Benyacoub y col. 2003). Por otra parte, la cepa de *E. faecalis* Symbioflor 1 resulta eficaz frente a las bronquitis y sinusitis crónicas de las personas por su efecto en la regulación del sistema inmune (Habermann y col., 2002). Existen igualmente otros preparados de *E. faecium* o *E. faecalis* con efectos beneficiosos para la salud. Así, por ejemplo, una cepa de *E. faecium*, que con dos cepas más de *St. thermophilus* constituyen la preparación denominada Causido® se emplea para producir un yogur que reduce los niveles de colesterol sanguíneo (Agerholm-Larsen y col., 2000). Asimismo, el preparado farmacéutico Medilac® con una mezcla de *Bacillus subtilis* y *E. faecium* ha demostrado reducir la intensidad y frecuencia del dolor abdominal en pacientes con síndrome de colon irritable (Kim y col., 2006). En lo que se refiere a la seguridad de los enterococos comercializados, conviene señalar que *E. faecium* SF68 no codifica factores potenciales de virulencia ni posee plásmidos conjugativos regulados por feromonas (Kayser, 2003). Por otra parte, la cepa de *E. faecalis* Symbioflor 1 no se asocia complejos clonales propios de aislados de infecciones hospitalarias y carece de los genes que codifican las proteínas Cyl, Esp y GelE, aunque codifica otros factores potenciales de virulencia como proteínas de agregación y adhesinas (Domann y col., 2007). En cualquier caso, es importante señalar que, a pesar de su empleo generalizado a concentraciones elevadas, no se ha descrito ningún caso de infección en personas y animales por ninguna de las dos cepas probióticas de *E. faecium* SF68 y *E. faecalis* Symbioflor 1.

También conviene citar que el Reglamento (CE) nº 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, sobre aditivos en alimentación animal regula el uso y registro de probióticos para alimentación animal. En este contexto, el registro de probióticos permitidos como aditivos incluye especies del género *Enterococcus* para su empleo en la alimentación de los cerdos, pollos y ganado vacuno así como en la de lechones y terneros durante los cuatro y seis primeros meses de vida, respectivamente (Becquet, 2003; Vahjen y col., 2007).

De lo descrito se concluye que el empleo de enterococos como cultivos iniciadores o probióticos mejora las características organolépticas de los alimentos y la salud de personas y animales aunque, no obstante, plantea controversias derivadas de la producción de factores potenciales de virulencia y de codificar genes de resistencia a antibióticos de uso en medicina humana. Por ello, es necesario asegurar que los enterococos que pudieran emplearse intencionadamente en los alimentos, preparaciones farmacéuticas y como aditivos en los piensos para animales no produzcan factores potenciales de virulencia ni codifiquen genes de resistencia a antibióticos, en particular a los de uso en terapia humana.

CAPÍTULO CHAPTER

3

Producción de péptidos inhibidores de la ECA y otros péptidos bioactivos por cepas de *Enterococcus faecalis* de origen alimentario, ambiental y clínico durante su desarrollo en leche desnatada de vaca

***Enterococcus faecalis* strains from food, environmental, and clinical origin produce ACE-inhibitory peptides and other bioactive peptides during their growth in bovine skim milk**

ABSTRACT

Eighty seven lactic acid bacteria (LAB) from different origins were evaluated for their ability to produce angiotensin-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity (ACE-IA) after growth in bovine skim milk (BSM). Only those cultures producing clear milk-derived hydrolysates showed high ACE-IA, with most (87% active) but not all (13% inactive) *Enterococcus faecalis* as the active LAB strains. Known ACE-inhibitory peptides (ACE-IP) and an antioxidant peptide were identified in the *E. faecalis* hydrolysates. Antimicrobial activity against *Pediococcus damnosus* CECT4797 and *Listeria ivanovii* CECT913 was also observed in the *E. faecalis* hydrolysates. The incidence of virulence factors in the *E. faecalis* strains with high ACE-IA and producers of ACE-IP was variable, but less virulence factors were observed in the food and environmental strains than in the clinical reference strains. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST) based analyses demonstrated that food and environmental *E. faecalis* strains were genetically different from those of clinical origin. Since most *E. faecalis* strains of clinical origin also originated milk-derived hydrolysates with ACE-IA and production of ACE-IP, the results of this work suggest that most *E. faecalis* strains of food, environmental and clinical origin have the ability to produce bovine milk-derived bioactive peptides with human health connotations and potential food, pharmaceutical, medical, and veterinary applications.

Keywords: Lactic acid bacteria (LAB), *Enterococcus faecalis*, bioactive peptides, ACE-inhibitory activity, ACE-inhibitory peptides, antimicrobial peptides

3.1. INTRODUCTION

Apart from their basic nutritional role, many dietary proteins contain, encrypted within their primary structure, peptide sequences or bioactive peptides with beneficial effects on human health, once released by digestive enzymes during their gastrointestinal transit, by fermentation or ripening during food processing or by hydrolysis with specific proteolytic enzymes and food grade proteolytic preparations sourced from animals, plants, and microbes. The released bioactive peptides exhibit antimicrobial, antioxidant, antithrombotic, antihypertensive, immunomodulatory, opioid, and antiproliferative activities, among others (López-Expósito and Recio, 2008; Mills et al., 2011). The potential of these bioactive peptides to reduce the risk of chronic diseases and to promote human health has aroused increasing scientific, applied and commercial interest (Hartman and Meissel, 2007; Korhonen, 2009; Phelan and Kerins, 2011).

Among the compounds derived from dietary proteins those with angiotensin-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity (ACE-IA), known as ACE-inhibitory peptides (ACE-IP), have been studied extensively due to their potential use in the treatment of elevated blood pressure and associated cardiovascular events (Phelan and Kerins, 2011). ACE is a regulatory factor in the renin-angiotensin system (RAS) with an important role in cardiovascular homeostasis, e.g., blood pressure regulation, and fluid and salt balance. In the RAS, the renin cleaves the liver-derived precursor angiotensinogen into the decapeptide angiotensin I, and ACE catalyzes the cleavage of angiotensin I to angiotensin II, a vasoconstrictor. In addition, ACE inactivates the vasodilative peptides bradykinin and kallidin, and stimulates the release of aldosterone, which increases blood pressure (Campbell, 2003; Cat and Toyuz, 2011). Untreated hypertension can lead to cardiovascular and renal diseases. Therefore, ACE-IP derived from food substrates are of interest in the development of functional foods with ACE-IA (Chen et al., 2009; Hernández-Ledesma et al., 2011; Sánchez et al., 2011; Martínez-Maqueda et al., 2012).

Lactic acid bacteria (LAB) are able to produce ACE-IP during growth in milk by the action of extracellular proteases, cell wall proteinases and intracellular peptidases (Yamamoto et al., 1994; Korhonen and Pihlanto, 2006; Otte et al., 2011). For production of fermented milk with ACE-IA, thermophilic and mesophilic LAB of dairy origin from the genera *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* and *Streptococcus* have been evaluated (Nakamura et al., 1995; Gobbetti et al., 2000; Minervini et al., 2003; Muguerza et al., 2006; Kilpi et al., 2007). Other LAB such as *Lactobacillus animalis* DPC6134, isolated from the porcine small intestine, also produce ACE-IP after growth in bovine sodium caseinate (Hayes et al., 2007). Fermentation conditions and the proteolytic activity of the specific LAB strains seem to modulate the ACE-IA and production of ACE-IP (Nielsen et al., 2009; Otte et al., 2011). The aim of this work was to evaluate LAB from different sources as potential cell factories for production of bovine milk-derived hydrolysates with ACE-IA.

3.2. MATERIALS AND METHODS

3.2.1. Microbial strains and growth conditions. A total of 87 LAB strains (1 *Enterococcus durans*, 24 *Enterococcus faecalis*, 16 *Enterococcus faecium*, 4 *Enterococcus hirae*, 5

Lactococcus garvieae, 13 *Lactococcus lactis*, 1 *Lactococcus raffinolactis*, 2 *Lactobacillus acidophilus*, 3 *Lactobacillus bulgaricus*, 2 *Lactobacillus casei*, 2 *Lactobacillus curvatus*, 1 *Lactobacillus fermentum*, 2 *Lactobacillus helveticus*, 1 *Lactobacillus johnsonii*, 1 *Lactobacillus paracasei*, 1 *Lactobacillus pentosus*, 1 *Lactobacillus plantarum*, 1 *Lactobacillus reuteri*, 2 *Lactobacillus rhamnosus*, 1 *Lactobacillus sakei*, 2 *Pediococcus acidilactici*, and 1 *Streptococcus thermophilus*) were evaluated in this work are shown in **Table 3.1**.

Table 3.1. Lactic acid bacteria (LAB) strains evaluated in this study.

Strains	Origin	Source and/or reference
<i>Enterococcus durans</i> AR3	Sewage water	HRC
<i>Enterococcus faecalis</i> BCS27	Dry salted cod	DNBTA; Gómez-Sala, 2006
<i>Enterococcus faecalis</i> BCS53	Dry salted cod	DNBTA; Gómez-Sala, 2006
<i>Enterococcus faecalis</i> CECT184	Cow milk	CECT
<i>Enterococcus faecalis</i> CECT4039	Cow cheese	CECT
<i>Enterococcus faecalis</i> CGV67	Norway lobster	DNBTA; Gómez-Sala, 2006
<i>Enterococcus faecalis</i> DBH18	Mallard ducks	DNBTA; Sánchez et al., 2007
<i>Enterococcus faecalis</i> LG101	Buffalo milk	DNBTA; Citti, 2005
<i>Enterococcus faecalis</i> LG187	Buffalo milk	DNBTA; Citti, 2005
<i>Enterococcus faecalis</i> P77	Octopus	DNBTA; Gómez-Sala, 2006
<i>Enterococcus faecalis</i> QA12	Aged buffalo cheese	DNBTA; Citti, 2005
<i>Enterococcus faecalis</i> QA21	Aged buffalo cheese	DNBTA; Citti, 2005
<i>Enterococcus faecalis</i> QA53	Aged buffalo cheese	DNBTA; Citti, 2005
<i>Enterococcus faecalis</i> QA127	Aged buffalo cheese	DNBTA; Citti, 2005
<i>Enterococcus faecalis</i> QF386	Buffalo mozzarella	DNBTA; Citti, 2005
<i>Enterococcus faecalis</i> QM38	Buffalo cheese	DNBTA; Citti, 2005
<i>Enterococcus faecalis</i> SDM37	Sardine	DNBTA; Gómez-Sala, 2006
<i>Enterococcus faecalis</i> SDP10	Sardine	DNBTA; Gómez-Sala, 2006
<i>Enterococcus faecalis</i> SMF10	Fresh Atlantic salmon	DNBTA; Gómez-Sala, 2006
<i>Enterococcus faecalis</i> SMF19	Fresh Atlantic salmon	DNBTA; Gómez-Sala, 2006
<i>Enterococcus faecalis</i> SMF54	Fresh Atlantic salmon	DNBTA; Gómez-Sala, 2006
<i>Enterococcus faecalis</i> P4	Human clinical	IFR; Eaton and Gasson, 2001
<i>Enterococcus faecalis</i> P36	Human clinical	IFR; Eaton and Gasson, 2001
<i>Enterococcus faecalis</i> 3Er1	Human clinical	HRC
<i>Enterococcus faecalis</i> H10	Human clinical	HRC
<i>Enterococcus faecium</i> AR50	Sewage water	HRC
<i>Enterococcus faecium</i> BCS59	Dry salted cod	DNBTA; Gómez-Sala, 2006
<i>Enterococcus faecium</i> BNM58	Albacore	DNBTA; Gómez-Sala, 2006
<i>Enterococcus faecium</i> CC17	Human clinical	HRC
<i>Enterococcus faecium</i> CECT410	Not defined	CECT
<i>Enterococcus faecium</i> CECT4102	Uncooked sausage	CECT
<i>Enterococcus faecium</i> CV1	Squid	DNBTA; Gómez-Sala, 2006
<i>Enterococcus faecium</i> DEC7	Mallard ducks	DNBTA; Sánchez et al., 2007
<i>Enterococcus faecium</i> L50	Dry-fermented sausage	DNBTA; Cintas et al., 2000
<i>Enterococcus faecium</i> LPP29	Bass	DNBTA; Gómez-Sala, 2006
<i>Enterococcus faecium</i> PLBC13	Wood pigeons	DNBTA; Martín et al., 2009
<i>Enterococcus faecium</i> PLBC21	Wood pigeons	DNBTA; Martín et al., 2009
<i>Enterococcus faecium</i> QM218	Ripened cheese	DNBTA; Citti, 2005
<i>Enterococcus faecium</i> SMA8	Smoked Atlantic salmon	DNBTA; Gómez-Sala, 2006
<i>Enterococcus faecium</i> TPP2	Rainbow trout	DNBTA; Gómez-Sala, 2006
<i>Enterococcus hirae</i> AR14	Sewage water	HRC
<i>Enterococcus hirae</i> AR20	Sewage water	HRC
<i>Enterococcus hirae</i> AR25	Sewage water	HRC

<i>Enterococcus hirae</i> DCH5	Mallard ducks	DNBTA; Sánchez et al., 2007
<i>Lactococcus garvieae</i> CECT4531	Bovine mastitis milk	CECT
<i>Lactococcus garvieae</i> CECT4828	Yellowtail kidney	CECT
<i>Lactococcus garvieae</i> CECT5274	Yellowtail kidney	CECT
<i>Lactococcus garvieae</i> CECT5806	Rainbow trout	CECT
<i>Lactococcus garvieae</i> CECT5807	Rainbow trout	CECT
<i>Lactococcus garvieae</i> DCC43	Mallard ducks	DNBTA; Sánchez et al., 2007
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CECT7100	Cheese starter	CECT
	MG1363 derivative	RUG-MG; Leenhouts et al., 1998
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LL108		
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363	NCDO712 derivative	IFR; Gasson, 1983
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NZ9000	MG1363, pepN::nisRK	NIZO; Kuipers et al., 1998
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CECT188	Not defined	CECT
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CECT539	Not defined	CECT
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CECT540	Not defined	CECT
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CECT4431	Not defined	CECT
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CECT4432	Not defined	CECT
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CECT4433	Not defined	CECT
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CECT4434	Not defined	CECT
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> DPC5598	DPC4268 derivative	DPC; Trotter et al., 2002
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403	IL594 derivative	Chopin et al., 1984
<i>Lactococcus raffinolactis</i> CECT988	Bovine milk	CECT
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CECT903	Human	CECT
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CECT4529	Chicken faeces	CECT
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> CECT4005	Yoghurt	CECT
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> CECT5037	Dairy	CECT
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> CECT5038	Dairy	CECT
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC334	Emmental cheese	ATCC
<i>Lactobacillus casei</i> CECT475	Cheese	CECT
<i>Lactobacillus curvatus</i> CECT904	Bovine milk	CECT
<i>Lactobacillus curvatus</i> BCS35	Dry salted cod	DNBTA; Gómez-Sala, 2006
<i>Lactobacillus fermentum</i> CECT4007	Fermented beet	CECT
<i>Lactobacillus helveticus</i> CECT402	Not defined	CECT
<i>Lactobacillus helveticus</i> CECT4305	Emmental cheese	CECT
<i>Lactobacillus johnsonii</i> CECT289	Bovine milk	CECT
<i>Lactobacillus paracasei</i> CECT4022	Not defined	CECT
<i>Lactobacillus pentosus</i> CECT4023	Not defined	CECT
<i>Lactobacillus plantarum</i> CECT748	Pickled cabbage	CECT
<i>Lactobacillus reuteri</i> CECT925	Human	CECT
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CECT275	Not defined	CECT
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CECT278	Not defined	CECT
<i>Lactobacillus sakei</i> CECT148	Not defined	CECT
<i>Pediococcus acidilactici</i> 347	Dry-fermented sausage	DNBTA; Moreira, 1994
<i>Pediococcus acidilactici</i> QF154	Cottage cheese	DNBTA; Citti, 2005
<i>Streptococcus thermophilus</i> CECT801	Yoghourt	CECT

Source abbreviations: ATCC, American Type Culture Collection (Rockville, MD); CECT, Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, Spain); DNBTA, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid (Madrid, Spain); DPC, Dairy Products Centre Culture Collection, Moorepark, Fermoy (County Park, Ireland); HRC, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid, Spain); IFR: Institute of Food Research, Norwich Research Park (Norwich, United Kingdom); NIZO, Department of Biophysical Chemistry, NIZO Food Research (Ede, The Netherlands); RUG-MG, Department of Molecular Genetics, University of Groningen (Haren, The Netherlands).

Reconstituted 10% (w/v) bovine skim milk-powder (BSM) (Oxoid, Cambridge, UK), heated at 121 °C for 5 min, was seeded with a loop of the frozen stock culture (-80 °C) and the cultures were grown at 32 or 37 °C for 24-48 h. A 3% (v/v) of the grown culture was then added to freshly made reconstituted 10% (w/v) BSM and the cultures were further grown at the corresponding temperature for 24 h. The cultures were then centrifuged at 8,000 x g for 10 min and their supernatants were filtered through 0.20 µm pore-size filters (Whatman Int. Ltd., Maidstone, UK) and stored at -20 °C before use.

3.2.2. Determination of the ACE-inhibitory activity (ACE-IA). The ACE-IA of the supernatants of the LAB grown in BSM was determined by a fluorometric assay (Sentandreu and Toldrá, 2006), with modifications (Quirós et al., 2009). The angiotensin converting enzyme (ACE, peptidyl-dipeptidase A, EC 3.4.15.1) was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and the ACE working solution was added to blank (B), control (C) or samples (S). The reaction was started by adding the fluorogenic substrate o-aminobenzoylglycyl-p-nitro-L-phenylalanyl-L-proline (Abz-Gly-p-Phe(NO₂)-Pro-OH) (0.45 mM, Bachem Feinchemikalien, Bubendorf, Switzerland), and the reaction mixture was incubated at 37 °C. The fluorescence of the samples was measured in a Multiscan Microplate Fluorimeter (FLUOstar optima, BMG Labtech, Offenburg, Germany) with the FLUOstar (version 1.32 R2, BMG Labtech) control system for processing of the data. The ACE-IA was expressed as the protein concentration required to inhibit 50% of the ACE activity (IC₅₀). The percentage of ACE-inhibitory activity was calculated as: $100 \times (C-S)/(C-B)$. This parameter was plotted *versus* protein concentration and non-linear adjustment was performed to estimate the IC₅₀ as previously described (Quirós et al., 2007). The protein concentration of the water-soluble extracts was determined by the Kjeldahl method or the BCA protein assay (Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, IL USA).

3.2.3. Analysis of the BSM-derived hydrolysates by on-line reversed-phase high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (RP-HPLC-MS/MS). The RP-HPLC-MS/MS analysis of the supernatants obtained during growth of the selected LAB strains in BSM was performed on an Agilent 1100 HPLC System (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) with column HiPore® (RP318 C₁₈ column 250 x 4.6 mm, 5 µm of particle size; Bio-Rad, Richmond, CA, USA). The HPLC system was connected on-line to an Esquire 3000 quadrupole ion trap (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) equipped with an electrospray ionization source, as previously described (Hernández-Ledesma et al., 2004). Solvent A was a mixture of water-trifluoroacetic acid (1000:0.37, v/v) and solvent B contained acetonitrile-trifluoroacetic acid (1000:0.27, v/v). Peptides were eluted with a linear gradient of solvent B in A from 0% to 45% in 60 min at a flow rate of 0.8 ml/min. Different spectra were recorded over the mass/charge (m/z) range 100–1500. About 5 spectra were averaged in the MS and in the MS(n) analyses. The signal threshold to perform auto MS(n) analyses was 10,000 (*i.e.*, 5% of the total signal) and the precursor ions were isolated within a range of 4.0 m/z and fragmented with a voltage ramp from 0.35 to 1.4 V. The m/z spectral data was transformed to mass values by using the Data Analysis™ (version 3.0; Bruker Daltonik) control program. The BioTools (version 2.1; Bruker Daltonik) was used to process the MS(n) spectra for peptide identification and sequencing.

3.2.4. Determination of the antimicrobial activity. The antimicrobial activity of supernatants of the *E. faecalis* strains grown in MRS broth (Oxoid) and reconstituted BSM at 37 °C for 24 h, was determined by an agar well diffusion test (ADT), as previously described (Borrero et al., 2011) using *Pediococcus damnosus* CECT4797 and *Listeria ivanovii* CECT913 as indicator strains.

3.2.5. Detection of potential virulence factors. The presence of genes coding for potential virulence factors was evaluated by PCR using primer pairs previously designed for detection of *cylL_L*-*cylL_S* (Martín et al., 2006), as well as for detection of *cylM*, *cylA*, *cylB*, *asa1*, *gelE*, *esp*, *efaAfs*, *cpd*, *cob*, and *ccf* (Eaton and Gasson, 2001), *ace* (Dupré et al., 2003), and *sprE* and *gelE-sprE* (Nakayama et al., 2002). *E. faecalis* P4 and *E. faecalis* P36, two human clinical strains, were used as the reference controls (Eaton and Gasson, 2001). PCR-amplifications were performed from purified genomic DNA of the *E. faecalis* strains using the Wizard DNA Purification Kit (Promega, Madrid, Spain) in 50 µl reaction mixtures with 1 to 3 µl of purified DNA, 70 pmol of each primer and 1 U of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Madrid, Spain). PCR products were analyzed by electrophoresis on 1.5% (w/v) agarose (Pronadisa, Madrid, Spain) gels with the Gel Doc 1000 documentation system (Bio-Rad, Madrid, Spain). For production of gelatinase, single colonies previously grown on MRS agar (Oxoid) were streaked onto Todd-Hewitt agar (Oxoid) containing 30 g of gelatin (Oxoid) per liter, grown overnight at 30 °C, and placed at 4 °C for 5 h before examination of zones of turbidity around the colonies. The caseinolytic activity of the isolates was evaluated by streaking the colonies onto TSA agar (Oxoid) containing 1.5% bovine skim milk powder (Oxoid) and overnight growth at 30 °C. A clear zone of hydrolysis within 24 h of growth was considered positive (Martín et al., 2006). For investigation of haemolytic activity, strains streaked onto 5% horse blood agar (BioMérieux, Madrid, Spain) were grown at 37 °C for 1 to 2 days. Haemolysis was evidenced by the formation of clear zones surrounding the colonies on blood agar plates.

3.2.6. Detection of biogenic amines genes. Purified genomic DNA from the *E. faecalis* strains was subjected to PCR amplification to detect the presence of tyrosine decarboxylase (*tdc*), agmatine deiminase (*agu*) and histidine decarboxylase (*hdc*) genes, using the primers and amplification conditions previously described (Ladero et al., 2012; Muñoz-Atienza et al., 2011).

3.2.7. Antibiotic susceptibility testing. The susceptibility of the *E. faecalis* strains to penicillin, ampicillin, erythromycin, tetracyclin, chloramphenicol, rifampicin, ciprofloxacin, levofloxacin, vancomycin, teicoplanin, nitrofurantoin, gentamicin, streptomycin, and quinupristin-dalfopristin was determined by using the ATB ENTEROC 5 strips (BioMérieux). The test was performed following the manufacturer's instructions. Results were recorded after 24 h incubation at 37 °C, using the breakpoints for enterococci proposed by the CLSI enterococci (CLSI, 2009).

3.2.8. Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) and Multilocus Sequence Typing (MLST) analysis. The clonal relationship among isolates was established by PFGE and MLST based analysis as previously described (Tenover et al., 1995; Coque et al., 1998; Ruiz-Garbajosa, et al., 2006). During PFGE, macro-restriction of purified genomic DNA of the *E. faecalis* strains of interest was carried out overnight at 30 °C in a restriction buffer containing 2.5 U of *Sma*I (Takara, Shiga, Japan). The chromosomal restriction fragments were separated by PFGE in a

CHEF DR-II system (Bio-Rad) containing a 1.2% (w/v) Pulsed Field Certified Agarose (Bio-Rad) gel. The electrophoresis was performed in an electrophoresis chamber equilibrated at 12 °C at a constant voltage of 6 V/cm, with pulse times ramping linearly from 5 to 35 s for 24 h (Coque et al., 1998). PFGE results were interpreted according to the criteria proposed (Tenover et al., 1995), and also by constructing a dendrogram based on the Dice's coefficient with the Phoretix v.5.0 software (Bio-Rad). For MLST analysis, purified genomic DNA from the *E. faecalis* strains of interest was used for PCR-amplification of internal fragments of seven housekeeping genes as previously described (Ruíz-Garbajosa et al., 2006). The resulting PCR products were purified with an ExoSAP-IT PCR cleanup reagent (USB Europe GmbH, Stauf, Germany), and sequenced in an ABI Prism 377 automated sequencer (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) at the Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid (Spain). Clusters of related sequence types (STs) were grouped into clonal complexes (CCs) by using eBURST (<http://www.mlst.net>).

3.2.9. Effect of temperature, and time of growth on the ACE-inhibitory activity (ACE-IA) and identification of the ACE-inhibitory peptides (ACE-IP). *E. faecalis* DBH18 and *E. faecalis* QA53 were grown in reconstituted BSM at 32, 37 and 45 °C during 24, 48, 72, 96, 120, and 144 h. Subsequently, the cultures were centrifuged at 8,000 x g for 10 min and their supernatants were filtered through 0.20 µm pore-size filters (Whatman). Aliquots of the samples were heated at 121 °C during 5 min and the low-molecular-mass peptides were recovered by centrifugal filtration (4,000 x g) of the samples through 3kDa cut-off membrane filters (Amicon ultra-4, Millipore, Billerica, MA, USA). The human clinical strains *E. faecalis* P4, *E. faecalis* P36, *E. faecalis* 3Er1, and *E. faecalis* H10 were also grown in BSM at 37 °C for 48 h. Determination of the ACE-IA, and identification of the ACE-IP, in permeates of the <3 KDa BSM-derived hydrolysates of the selected *E. faecalis* strains was performed as described above.

3.3. RESULTS

3.3.1. Growth of selected lactic acid bacteria (LAB) in bovine skim milk (BSM), determination of its ACE-inhibitory activity (ACE-IA), and identification of the major peptide fragments. A total of 87 LAB isolates from food (60.2%) (from which 27.7% were from milk and dairy products, 24.1% from fish and fish products, and 6% from meat and meat products), as well as from environmental sources (15.7%) and from non-defined sources (24.1%) (Table 3.1), were grown in BSM after which the cultures were observed to produce a clear hydrolysate (21.7%), a slight hydrolysate (3.6%), a flocculate (14.5%), a curd (20.5%) or no modifications of the milk-derived medium (39.8%). When supernatants of the cultures were evaluated for their ACE-IA only those producing clear hydrolysates showed ACE-IA with IC₅₀ values from 16.1 to 28.4 µg protein/ml. Among the LAB evaluated, only the *E. faecalis* strains were able to produce clear milk-derived hydrolysates with high ACE-IA although, noticeably, two of them namely *E. faecalis* CECT4039 and *E. faecalis* P77 produced a flocculate and a curd, respectively, with no measurable ACE-IA (Table 3.2).

Table 3.2. ACE-inhibitory activity (ACE-IA)^a of supernatants of *E. faecalis* strains grown in BSM.

Strain	Origin	BSM culture modifications	IC ₅₀ (µg protein/ml)	Source or Reference ^b
<i>E. faecalis</i> BCS27	Dry salted cod	Hydrolysate	28.4	DNBTA; Gómez-Sala, (2006)
<i>E. faecalis</i> BCS53	Dry salted cod	Hydrolysate	26.3	DNBTA; Gómez-Sala, (2006)
<i>E. faecalis</i> CECT184	Cow milk	Hydrolysate	16.1	CECT
<i>E. faecalis</i> CECT4039	Cow cheese	Flocculate	NA	CECT
<i>E. faecalis</i> CGV67	Norway lobster	Hydrolysate	24.9	DNBTA; Gómez-Sala, (2006)
<i>E. faecalis</i> DBH18	Mallard ducks	Hydrolysate	23.8	Sánchez et al., (2007)
<i>E. faecalis</i> LG101	Buffalo milk	Hydrolysate	16.1	DNBTA, Citti, (2005)
<i>E. faecalis</i> LG187	Buffalo milk	Hydrolysate	25.2	DNBTA; Citti, (2005)
<i>E. faecalis</i> P77	Octopus	Curd	NA	DNBTA; Gómez-Sala, (2006)
<i>E. faecalis</i> QA12	Aged buffalo cheese	Hydrolysate	22.8	DNBTA, Citti, (2005)
<i>E. faecalis</i> QA21	Aged buffalo cheese	Hydrolysate	19.5	DNBTA, Citti, (2005)
<i>E. faecalis</i> QA53	Aged buffalo cheese	Hydrolysate	24.8	DNBTA, Citti, (2005)
<i>E. faecalis</i> QA127	Aged buffalo cheese	Hydrolysate	20.8	DNBTA, Citti, (2005)
<i>E. faecalis</i> QF386	Buffalo mozzarella	Hydrolysate	21.4	DNBTA, Citti, (2005)
<i>E. faecalis</i> QM38	Buffalo cheese	Hydrolysate	17.8	DNBTA, Citti, (2005)
<i>E. faecalis</i> SDM37	Sardine	Hydrolysate	25.1	DNBTA; Gómez-Sala, (2006)
<i>E. faecalis</i> SDP10	Sardine	Hydrolysate	26.3	DNBTA; Gómez-Sala, (2006)
<i>E. faecalis</i> SMF10	Fresh salmon	Hydrolysate	23.5	DNBTA; Gómez-Sala, (2006)
<i>E. faecalis</i> SMF19	Fresh salmon	Hydrolysate	20.8	DNBTA; Gómez-Sala, (2006)
<i>E. faecalis</i> SMF54	Fresh salmon	Hydrolysate	27.3	DNBTA; Gómez-Sala, (2006)

^a ACE-inhibitory activity (ACE-IA) as IC₅₀ (µg protein/ml). Data are mean from two independent determinations in triplicate.

NA: No ACE-IA detected.

^b Source abbreviations: CECT, Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, Spain); DNBTA, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid (Madrid, Spain).

RP-HPLC-MS/MS analysis of supernatants of the *E. faecalis* strains with high ACE-IA allowed the identification of 27 major peptide fragments, 20 of which corresponded to bovine β -casein fragments and 7 to α _{s1}-casein fragments, including peptides with previously reported ACE-IA and antioxidant activity (Table 3.3).

Table 3.3. Major peptide fragments in supernatants of *E. faecalis* strains grown in BSM.

Observed mass	Calculated mass ^a	Protein fragment	Peptide Sequence	Previously described ACE-inhibitory peptides (ACE-IP) ^b	<i>E. faecalis</i> strain
646.3	646.336	β -CN f(53-58)	AQTQSL	-----	6,8,11
656.2	656.477	β -CN f(99-103)	VVPPF	VVPPF	1,4
671.3	671.383	β -CN f(201-206)	VRGPFP	VRGPFP	1,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,15
674.3	674.331	β -CN f(1-5)	RELEE	-----	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15
680.3	680.320	β -CN f(52-57)	FAQTQS	-----	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15
688.4	688.434	β -CN f(133-138)	LHLPLP	LHLPLP	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15
689.3	689.330	β -CN f(127-132)	LTDVEN	-----	5
697.2	697.299	β -CN f(119-124)	FTESQS	-----	1,4,5,7,8,9,10,13
742.3	742.350	β -CN f(181-186)	PQRDMP	-----	1,2,4,3,7,8,9,10,11,12
759.3	759.456	β -CN f(95-101)	VSKVKET	VPKVKET	13
761.3	761.403	β -CN f(191-196)	LLYQEP	-----	2,4,5,11
779.4	779.498	β -CN f(170-176)	VLPVPQK	-----	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15
801.6	801.519	β -CN f(133-139)	LHLPLPL	LHLPLPL	1,4,13,14,15
827.3	827.400	β -CN f(50-56)	HPFAQTQ	-----	3,6,8,9,10,11,12
849.3	849.478	β -CN f(45-51)	LQDKIHP	DKIHP	3,13
871.4	871.568	β -CN f(23-29)	ITRINKK	-----	1,3,13
903.3	903.462	β -CN f(125-132)	LTLTDVEN	-----	3,4,13,14,15
996.5	996.619	β -CN f(201-209)	VRGPFPIIV	VRGPFPIIV	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15
1,037.4	1,037.609	β -CN f(197-206)	VLGPVRGPFP	VLGPVRGPFP	4
1,086.4	1,086.582	β -CN f(88-97)	LQPEVMGVSK	-----	14
1,322.5	1,322.790	β -CN f(165-176)	LSQSKVLVPQK	-----	1,14
547.4	547.356	α_{S1} -CN f(20-23)	LLRF	ENLLRF	1,7,8
633.4	633.378	α_{S1} -CN f(1-5)	RPKHP	-----	1,4,5,12,15
706.3	706.409	α_{S1} -CN f(31-36)	VFGKEK	-----	1,4,15
800.3	800.392	α_{S1} -CN f(120-126)	LHSMKEG	-----	1,2,3,6,7,8,9,10,11,12
949.4	949.505	α_{S1} -CN f(127-134)	IHAQKEP	-----	1,6,8,9,10,11,12
1,002.5	1002.630	α_{S1} -CN f(101-108)	LKKYKVPQ	KKYNVPQ	1,8,10

^a Monoisotopic mass.^b Previously described ACE-inhibitory peptides (ACE-IP) with ACE-IA or sharing, at least, three C-terminal amino acid residues with those found in this study.*E. faecalis* strain: 1. *E. faecalis* BCS27; 2. *E. faecalis* BCS53; 3. *E. faecalis* CECT184; 4. *E. faecalis* CGV67; 5. *E. faecalis* DBH18; 6. *E. faecalis* LG101; 7. *E. faecalis* QA12; 8. *E. faecalis* QA21; 9. *E. faecalis* QA53; 10. *E. faecalis* QA127; 11. *E. faecalis* QF386; 12. *E. faecalis* QM38; 13. *E. faecalis* SDM37; 14. *E. faecalis* SDP10; 15. *E. faecalis* SMF54.

3.3.2. Antimicrobial activity of supernatants of different *E. faecalis* strains. Determination of the antimicrobial activity of selected *E. faecalis* strains with elevated ACE-IA, and grown in MRS, showed that only the supernatant of *E. faecalis* DBH18 displayed a clear halo of inhibition against *P. damnosus* CECT4797 and *L. ivanovii* CECT913. However, supernatants from all *E. faecalis* strains, grown in BSM, showed clear halos of inhibition against both indicator microorganisms (Fig. 3.1).

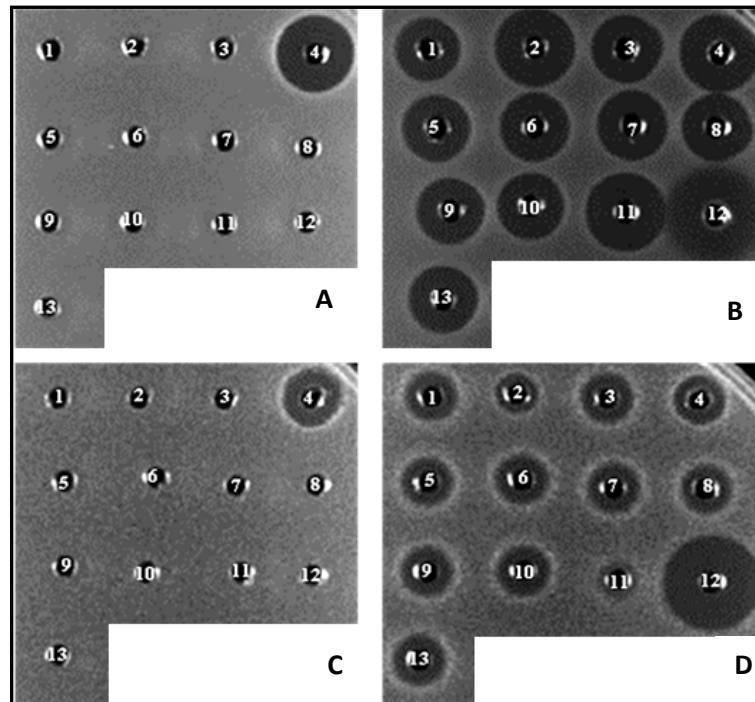


Fig. 3.1. Antimicrobial activity of supernatants of *E. faecalis* strains grown in MRS (A and C) and BSM (B and D) as determined by an agar well diffusion test (ADT) with *P. damnosus* CECT4797 (A and B) and *L. ivanovii* CECT913 (C and D) as the indicator microorganisms. Supernatants of: *E. faecalis* BCS53 (1); *E. faecalis* CECT184 (2); *E. faecalis* CGV67 (3); *E. faecalis* DBH18 (4); *E. faecalis* LG101 (5); *E. faecalis* QA12 (6); *E. faecalis* QA21 (7); *E. faecalis* QA53 (8); *E. faecalis* QF386 (9); *E. faecalis* QM38 (10); *E. faecalis* SDM37 (11); *E. faecalis* SDP10 (12); and *E. faecalis* SMF54 (13).

3.3.3. Virulence determinants and antibiotic resistance. The results of the evaluation of genes coding for potential virulence factors in the selected *E. faecalis* strains are shown in **Table 3.4**. Interestingly, none of the evaluated *E. faecalis* strains, except *E. faecalis* SDM37 and *E. faecalis* SDP10, showed determinants for synthesis of the cytolysin (haemolysin-bacteriocin precursor) and genes involved in their secretion and maturation. Similarly, only *E. faecalis* CECT184, *E. faecalis* DBH18, and *E. faecalis* QA12 lacked the presence of the *asa1* determinant, whereas *E. faecalis* CGV67, *E. faecalis* DBH18, *E. faecalis* LG101, *E. faecalis* QA21, *E. faecalis* QA53, and *E. faecalis* SMF54 lacked the presence of the *esp* gene. All the *E. faecalis* strains showed determinants for production of gelatinase (*gelE*) and serine protease (*sprE*).

Table 3.4. PCR amplification of genes related to potential virulence factors in *E. faecalis* strains with ACE-inhibitory activity (ACE-IA).

Strain	Virulence determinants													
	<i>cylL-cylLs</i>	<i>cylM</i>	<i>cylA</i>	<i>cylB</i>	<i>asa1</i>	<i>ace</i>	<i>gelE</i>	<i>gelE-sprE</i>	<i>sprE</i>	<i>esp</i>	<i>efaA_{fs}</i>	<i>cpd</i>	<i>cob</i>	<i>ccf</i>
<i>E. faecalis</i> BCS53	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
<i>E. faecalis</i> CECT184	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. faecalis</i> CGV67	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+
<i>E. faecalis</i> DBH18	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+
<i>E. faecalis</i> LG101	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+
<i>E. faecalis</i> QA12	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
<i>E. faecalis</i> QA21	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+
<i>E. faecalis</i> QA53	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+
<i>E. faecalis</i> QF386	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>E. faecalis</i> QM38	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
<i>E. faecalis</i> SDM37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. faecalis</i> SDP10	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>E. faecalis</i> SMF54	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+
<i>E. faecalis</i> P4 ^a	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>E. faecalis</i> P36 ^a	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+

^a *E. faecalis* P4 and *E. faecalis* P36 were used as controls in the PCR reactions.

Investigation of the presence of three sex pheromone genes (*ccf*, *cob* and *cpd*) revealed the presence of *ccf* and *cpd* in all isolates, and the absence of *cob* in some of them. All the *E. faecalis* strains showed hydrolysis of gelatinase and casein, while only *E. faecalis* SDM37 and *E. faecalis* SDP10 were haemolytic. None of the *E. faecalis* strains showed the presence of the histidine decarboxylase (*hdc*) and ornithine decarboxylase (*odc*) genes, but amplified the tyrosine decarboxylase (*tdc*) determinant. All the *E. faecalis* strains were susceptible to most of the antibiotics tested, with a low resistance to erythromycin (MIC <4 µg/ml) and rifampicin (MIC <2 µg/ml).

3.3.4. Genetic relatedness of the *E. faecalis* strains. PFGE analysis of the evaluated *E. faecalis* strains showed that all food and environmental strains clustered into a major group, separated from the reference human clinical *E. faecalis* P4 and *E. faecalis* P36 strains (**Fig. 3.2**). Similarly, the group containing the *E. faecalis* isolates of food and environmental origin showed two well-differentiated branches with isolates clustering with different coefficients of correlation possibly related to their different isolation sources. Comparison of the allelic profiles of *E. faecalis* DBH18 and *E. faecalis* QA53 in the *E. faecalis* MLST database permitted their annotation as ST167 and ST165, respectively. *E. faecalis* DBH18-ST167 was not related to other described STs, whereas *E. faecalis* QA53-ST165 was a single locus variant of *E. faecalis* ST226, described in Norway as causing a human infection.

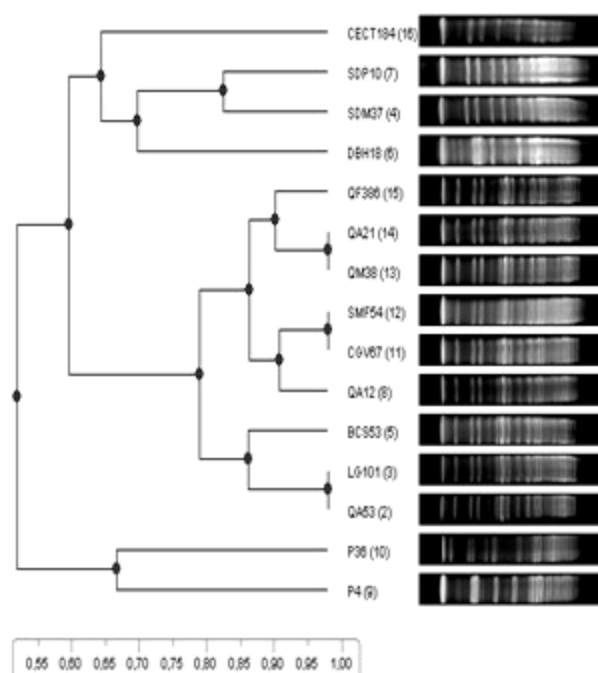


Fig. 3.2. Dendrogram based on the Dice's coefficient showing the genetic relatedness among *E. faecalis* based on PFGE-*SmaI* digestion patterns.

3.3.5. Effect of time and temperature of growth on the ACE-IA and production of ACE-IP by *E. faecalis* strains from food, environmental and clinical origin. Determination of the ACE-IA of *E. faecalis* DBH18 and *E. faecalis* QA53 grown in BSM at different temperatures (32, 37 and

45 °C) and times (24, 48, 72, 96, 120 and 144 h), showed that growth of the strains at 37 °C during 48 to 96 h results in optimal ACE-IA (**Table 3.5**).

Table 3.5. ACE-inhibitory activity (ACE-IA)^a of supernatants of *E. faecalis* strains grown in BSM.

Strain	Temp. (°C)	Time (h)						
		0	24	48	72	96	120	144
<i>E. faecalis</i> DBH18	32	NA	26.5	23.8	22.6	20.1	18.8	18.5
<i>E. faecalis</i> DBH18	37	NA	15.5	11.7	14.9	11.2	15.9	18.3
<i>E. faecalis</i> DBH18	45	NA	47.1	41.9	38.4	23.2	19.9	21.7
<i>E. faecalis</i> QA53	32	NA	22.1	20.2	35.0	20.8	10.6	9.2
<i>E. faecalis</i> QA53	37	NA	15.2	12.8	14.2	10.2	16.5	16.1
<i>E. faecalis</i> QA53	45	NA	179.9	162.7	143.5	128.1	100.6	89.3

^a ACE-inhibitory activity (ACE-IA) as IC₅₀ (µg protein/ml). Data are mean from two independent determinations in triplicate.

NA: No ACE-IA detected.

Accordingly, the ACE-IA of different *E. faecalis* strains from food, environmental, and clinical origin was also determined after growth in BSM at 37 °C during 48 h. The resulting supernatants showed IC₅₀ values ranging from 24.3 to 38.4 µg protein/ml. The lowest IC₅₀ values and, consequently, the highest ACE-IA, were found for *E. faecalis* DBH18 and *E. faecalis* P4. The CC2-*E. faecalis* H10 and the CC9-*E. faecalis* 3Er1 human clinical strains, also showed an elevated ACE-IA. However, the clinical *E. faecalis* P36 isolate did not produce clear milk-derived hydrolysates with a measurable ACE-IA (**Table 3.6**).

Table 3.6. ACE-inhibitory activity (ACE-IA)^a of supernatants of *E. faecalis* strains grown in bovine skim milk (BSM), at 37 °C during 48 h, and filtered through <3 kDa cut-off membrane filters.

Strain	IC ₅₀ (µg protein/ml)
<i>E. faecalis</i> DBH18	24.3
<i>E. faecalis</i> QA53	34.2
<i>E. faecalis</i> P4	25.9
<i>E. faecalis</i> P36	NA
<i>E. faecalis</i> 3Er1	38.4
<i>E. faecalis</i> H10	27.9

^a ACE-inhibitory activity (ACE-IA) as IC₅₀ (µg protein/ml). Data are mean from two independent determinations in triplicate.

NA: No ACE-IA detected.

The major peptides in permeates of the <3kDa filtered-hydrolysates of the evaluated strains were identified by RP-HPLC-MS/MS. More than 50% of the major peptides were identical to those previously identified in the non-filtered supernatants, including peptides with previously reported ACE-IA and antioxidant activity (**Table 3.7**).

Table 3.7. Major peptide fragments in supernatants of *E. faecalis* strains grown in bovine skim milk (BSM), at 37 °C during 48 h, and filtered through <3 kDa cut-off membrane filters.

Observed mass	Calculated mass ^a	Protein fragment	Peptide sequence	<i>E. faecalis</i> strain
384.2	384.245	β -CN f(197-200)	VLGP	2,3,6
633.4	633.331	β -CN f(63-68)	PGPIHN	1,3
645.4	645.356	β -CN f(139-143)	LLQSW	2
668.2	668.398	β -CN f(74-79)	IPPLTQ	3,5
671.3	671.383	β -CN f(201-206)	VRGPF	1,2,3,6
674.3	674.331	β -CN f(1-5)	RELEE	1,2,3
680.3	680.320	β -CN f(52-57)	FAQTQS	1,3,5,6
688.4	688.434	β -CN f(133-138)	LHLPLP	1,2,3,5,6
697.2	697.299	β -CN f(119-124)	FTESQS	1,2,3,6
742.3	742.350	β -CN f(181-186)	PQRDMP	1,2,3
761.3	761.403	β -CN f(191-196)	LLYQEP	2,3,6
772.4	773.386	β -CN f(88-94)	LQPEVMG	1,3
779.4	779.498	β -CN f(170-176)	VLPVPQK	1,2,3,6
801.6	801.519	β -CN f(133-139)	LHLPLPL	1,2
871.4	871.568	β -CN f(23-29)	ITRINKK	2
903.3	903.462	β -CN f(125-132)	LTLTDVEN	1,6
915.4	915.603	β -CN f(133-140)	LHLPLPLL	3,5
996.5	996.619	β -CN f(201-209)	VRGPFPIV	1,2,3,6
1,037.4	1,037.609	β -CN f(197-206)	VLGPVRGPF	2
1,196.4	1,196.688	β -CN f(77-87)	LTQTPVVPPF	1,2,3
547.4	547.356	α _{S1} -CN f(20-23)	LLRF	1,2
580.3	581.293	α _{S1} -CN f(169-173)	LGTQY	6
596.3	596.314	α _{S1} -CN f(150-153)	FRQF	1
633.4	633.378	α _{S1} -CN f(1-5)	RPKHP	1
676.4	676.366	α _{S1} -CN f(24-29)	FVAPFP	1,2,3,5,6
683.4	683.393	α _{S1} -CN f(109-114)	LEIVPK	3,5,6
700.4	700.383	α _{S1} -CN f(15-20)	VLNENL	2,3,5,6
800.3	800.392	α _{S1} -CN f(120-126)	LHSMKEG	2
822.4	822.435	α _{S1} -CN f(28-34)	FPEVFGK	1
825.6	825.431	α _{S1} -CN f(182-189)	IPNPIGSE	1

^a Monoisotopic mass.

E. faecalis strain: 1. *E. faecalis* DBH18; 2. *E. faecalis* QA53; 3. *E. faecalis* P4; 4. *E. faecalis* P36; 5. *E. faecalis* 3E and 6. *E. faecalis* H10.

3.4. DISCUSSION

A total of 87 LAB strains of food and environmental origin were evaluated for their ACE-IA after growth in BSM. Only cultures showing clear milk-derived hydrolysates due to growth of the *E. faecalis* strains displayed high ACE-IA due to low IC₅₀ inhibitory concentrations (<100 µg

protein/ml) (**Table 3.2**). The degree of bovine milk-derived hydrolysis correlated with the extent of ACE-IA, as observed with other proteolytically active LAB (Pihlanto et al., 2010). The IC₅₀ values of most *E. faecalis* hydrolysates was low (16.1 to 28.4 µg protein/ml), and comparable to the IC₅₀ of the ACE-inhibitor (S)-N-(1[ethoxycarbonyl]-3-phenylpropyl)-ala-pro maleate (enalapril) of 49.5 µg/ml (100 µM) (Minervini et al., 2003). Although *E. faecalis* strains from dairy origin have been shown to produce milk-derived hydrolysates with ACE-IA (Muguerza et al., 2006; Regazzo et al., 2010; Chaves-López et al., 2011), the results of this study suggest that this potential is also present in *E. faecalis* isolates from other food and environmental sources. However, most (90% active) but not all (10% inactive) of the evaluated *E. faecalis* strains produced BSM-derived hydrolysates with high ACE-IA (**Table 3.2**).

Analysis by RP-HPLC-MS/MS of the major peptide fragments in the milk-derived hydrolysates of the most active ACE-IA *E. faecalis* strains suggest that some of the peptides such as LQDKIHP [f(47-51)], VSKVKET [f(95-101)], VVPPF [f(99-103)], LHLPLP [f(133-138)], LHLPLPL [f(133-139)], VLGPVRGPFP [f(197-206)], VRGPFP [f(201-206)], and VRGPFPIIV [f(201-209)] derived from bovine β-casein while others, such as LLRFP [f(20-23)] and LKKYKVPQ [f(101-108)] derived from bovine α_{s1}-casein (**Table 3.3**). These peptide fragments have been reported to show a high ACE-IA or share, at least, three C-terminal residues with those with ACE-IA (Gómez-Ruiz et al., 2002; Quirós et al., 2005; Contreras et al., 2009). Most of the identified ACE-IP are rich in the amino acid proline, one of the most favourable residues for peptide binding to the active site of ACE. Furthermore, the identified LHLPLP peptide is known to be resistant to gastrointestinal proteases, is a true competitive inhibitor of ACE, and shows a potent antihypertensive activity in spontaneously hypertensive rats (SHR) (Miguel et al., 2006; Quirós et al., 2009). On the other hand, the peptide VLPVPQK [β-casein, f(170-176)], previously reported as antioxidant (Rival et al., 2001), has been also identified among the major peptides present in all *E. faecalis* hydrolysates (**Table 3.3**). The presence of potential antioxidant peptides during growth of *E. faecalis* in BSM has not been previously recorded.

The major peptides identified in the hydrolysates of the *E. faecalis* strains may be subject to variations due to complex interactions between growth of the enterococci, their proteolytic activity, and hydrolysis of the substrate. In this context, several β-casein-derived peptides such as RELEE [f(1-5)], FAQTQS [f(52-57)], LHLPLP [f(133-138)], VLPVPQK [f(170-176)], and VRGPFPIIV [f(201-209)] were present in the hydrolysates of all the *E. faecalis* strains, whereas other β-casein-derived peptides such as VLGPVRGPFP [f(88-97)], VSKVKET [f(95-101)], LTDVEN [f(127-132)], and VLGPVRGPFP [f(197-206)] were less frequent (**Table 3.3**). However, regardless of the different peptide profile of the *E. faecalis* hydrolysates all of them contained, at least, ACE-IP LHLPLP and VRGPFPIIV and the antioxidant peptide VLPVPQK. Moreover, supernatants of all the *E. faecalis* strains grown in BSM showed antimicrobial activity against *P. damnosus* CECT4797 and *L. ivanovii* CECT913 (**Fig. 3.1**). However, *E. faecalis* DBH18 was the only strain that showed antimicrobial activity after growth in MRS and BSM probably due to its proven bacteriocinogenic activity (Sánchez et al., 2007). The observation that *E. faecalis* strains may produce bovine milk-derived hydrolysates with various biological activities may not be surprising considering the existence of peptide sequences with encrypted multiple biological activities (Meisel et al., 2006). Accordingly, most of the *E. faecalis* strains of food and

environmental origin evaluated in this work produce bovine milk hydrolysates with ACE-IA, potential antioxidant activity, and antimicrobial activity raising expectations for their use as potential cell factories for production of bioactive peptides or as probiotics in diverse food and feed applications.

The enterococci have a beneficial role in the development of the sensory characteristics of fermented foods, and some as permitted as probiotics (Franz et al., 2011). However, the enterococci are also gastrointestinal (GI) tract colonizers, with lifestyles ranging from intestinal symbionts to multidrug-resistant pathogens responsible of nosocomial and, to a lesser extent, community-acquired infections (Willems et al., 2011). Accordingly, the occurrence of potential virulence factors among potentially useful *E. faecalis* strains should be evaluated. The virulence of the enterococci requires a susceptible host, but also reflects a selection for specific bacterial variants or clones with enhanced pathogenic potential. In this context, the epidemiological typing of *E. faecalis* and *E. faecium* strains has mainly been performed by PFGE and MLST analysis. Furthermore, MLST-based studies have demonstrated the association between specific clonal complexes and host for *E. faecium* (van Shaik and Willems, 2010), and human nosocomial infections for *E. faecalis* (Ruiz-Garbajosa et al., 2006; Galloway-Peña et al., 2012). The pathogenicity of the enterococci is ligated to the carriage of virulence factors and the acquisition of multi-drug resistance genotypes, mainly due to the plasticity of their genomes and the lack of CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) elements for protection against incoming DNA (Ogier and Serror, 2008; Arias and Murray, 2012).

Among the *E. faecalis* strains evaluated in this study, only *E. faecalis* SDM37 and *E. faecalis* SDP10 showed the *cylLMAB* genes for expression of the two-peptide cytolysin (haemolysin-bacteriocin) usually encoded on pheromone-responsive plasmids or pathogenicity islands (**Table 3.4**). *E. faecalis* expressing *cyl* are more virulent in animal models than isogenic strains without *cyl* (Coburn et al., 2004; Coburn et al., 2007). Insertion/deletion events leading to truncated or absent *cyl* genes and possible sequence divergences in genes coding for the structural subunits of the cytolysin, may explain the difficulties to tackle genes involved in production of active cytolysins (Pillar and Gilmore, 2004). Similarly, all the *E. faecalis* isolates included in our work encodes Ace, a microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules and an important element in the initial stages of infection. In addition, most of them (77%) encode an aggregation substance protein (Asa1) that cause clumping of *E. faecalis* cells and mediate high-frequency transfer of plasmid DNA (Arias and Murray, 2012). Fewer (46%) of the *E. faecalis* isolates encode the enterococcal surface protein Esp that, anchored to the cell wall, affect biofilm formation and have a role in experimental infections in animal models (Shankar et al., 2001). The absence of *esp* is, accordingly, a positive attribute for *E. faecalis*. However, both *esp* and *asa1* genes are present in the commercial probiotic strain *E. faecalis* Symbioflor1 (Domann et al., 2007).

All the *E. faecalis* strains with high ACE-IA carried the *gelE* and *sprE* genes and showed gelatinase activity, although the presence of silent *gelE* genes has been previously reported in food and clinical strains (Eaton and Gasson, 2001; Silva Lopes et al., 2006). Recent proteomic studies have revealed that extracellular protein expression patterns differ significantly among *E.*

faecalis strains of food and clinical origin although both GelE and SprE were detected in all supernatants, suggesting that protease expression is strain specific and not representative of the clinical isolates. Genetic analyses also revealed that not only *gelE* and *sprE*, but also the regulatory *fsrABCD* genes must be present to allow protease expression (Pessione et al., 2012). Sex pheromone production in *E. faecalis* due to the expression of *cpd*, *cob*, and *ccf* genes is not a desirable trait since it may promote acquisition of antibiotic resistance and other linked traits from other enterococci, thus leading to increased virulence (Eaton and Gasson, 2001). In this work, the number of genes encoding potential virulence factors was less in the *E. faecalis* strains of food and environmental origin than in those of clinical origin, used as reference. The virulence profile was not related to the source or origin of the strains (**Table 3.4**). However, the occurrence of multiple virulence factors in *E. faecalis* may contribute to their competitiveness in different ecological niches.

The presence of *tdc* but not *odc* or *hdc* in the evaluated *E. faecalis* strains agrees with the suggestion that tyramine biosynthesis is a species-level characteristic in *E. faecalis*. Nevertheless, production of tyramine may be significant only after very long ripening periods (Ladero et al., 2012). As expected, the *E. faecalis* strains of food and environmental origin, subjected to PFGE, showed a clearly distinct genetic relatedness among them and compared to the reference clinical strains (**Fig. 3.2**). On the other hand, the MLST analysis of *E. faecalis* QA53 and *E. faecalis* DBH18, preferred for the analysis of ancestral relationships (Ruiz-Garbajosa et al., 2006), identified both strains with the sequence types ST165 and ST167, respectively, none of them included into the clonal complexes CC2 and CC9 of the hospital-adapted *E. faecalis* isolates (Ruiz-Garbajosa et al., 2006; Arias and Murray, 2012).

The growth of *E. faecalis* DBH18 and *E. faecalis* QA53, two of the strains containing less virulence factors and genotypically different from the hospital-adapted *E. faecalis* isolates, under different conditions in BSM suggested that their ACE-IA was better during growth at 37 °C than at 32 °C or 45 °C, and similar after 48 or 96 h of growth (**Table 3.5**). Samples incubated at 45 °C showed the worst ACE-IA. Since extended fermentation times involve higher energy and economical expenses and increase the chance of microbial contamination, the growth of *E. faecalis* strains at 37 °C for 48 h in BSM was considered as appropriate for production of bovine milk-derived hydrolysates with high ACE-IA.

Furthermore, since *E. faecalis* strains of food and environmental origin produced bovine milk-derived hydrolysates with high ACE-IA experiences were performed to evaluate the ACE-IA and production of ACE-IP during growth of the human clinical *E. faecalis* P4, *E. faecalis* P36, *E. faecalis* 3Er1, and *E. faecalis* H10 strains, at 37 °C in BSM. The ACE-IA of the filtered <3 kDa permeates, generated to obtain *E. faecalis* hydrolysates potentially free of enterococcal virulence factors, revealed that those from *E. faecalis* DBH18 and *E. faecalis* QA53 showed about two to three times lower ACE-IA (**Table 3.6**) than those from the unfiltered hydrolysates (**Table 3.5**), but still with a high ACE-IA. The lower ACE-IA of the filtered hydrolysates may be due to loss of higher molecular mass peptides with synergic inhibitory activity (Gobbetti et al., 2000). Most importantly, the ACE-IA of the clinical *E. faecalis* P4 was similar to that produced by *E. faecalis* DBH18 and *E. faecalis* QA53, while *E. faecalis* P36 did not produce bovine milk-derived

hydrolysates or a measurable ACE-IA (**Table 3.6**). This is an interesting observation, since *E. faecalis* P36 is recorded as *gelE*⁺ but *Gel*⁻ (Eaton and Gasson, 2001). The growth of *E. faecalis* 3Er1 and *E. faecalis* H10, two hospital-adapted strains of the MLST-based CC2 and CC9 complexes, respectively, also produced bovine milk-derived hydrolysates of high ACE-IA (**Table 3.6**). Accordingly, is possible that *GelE* and/or the regulatory *fsr* genes could play a role in the production of bioactive peptides during growth of *E. faecalis* in bovine milk. Furthermore, despite their importance for *E. faecalis* virulence and stress responses inside the host (Nakayama et al., 2002; Bourgoigne et al., 2006), both the *Fsr* system and the *GelE* and *SprE* proteins may play a role, not associated with virulence, in the production of bioactive peptides by *E. faecalis* strains from food, environmental, and clinical sources.

Interestingly, major peptide fragments were detected in samples from all the evaluated clinical *E. faecalis* strains except in those of *E. faecalis* P36 (**Table 3.7**). The ACE-IP with the ACE-IA or the antihypertensive peptides LHLPLPL, VRGPFPIIV and VLGPVRGPFP, and the antioxidant peptide VLPVPQK were identified in most of the bovine milk-derived hydrolysates, while the antihypertensive peptide LHLPLP was identified in the supernatants of all the *E. faecalis* strains with ACE-IA. Furthermore, the β -casein derived fragment LTQTPVVPPF [*f*(77-87)], with ACE-IA (Quirós et al., 2007), not detected in the hydrolysates of the unfiltered samples (**Table 3.6**), was also detected in the hydrolysates of some of filtered *E. faecalis* strains (**Table 3.7**). Thus, ACE-IP are also present in the filtered (<3kDa cut-off membranes) milk-derived produced by food and clinical *E. faecalis* strains and thus, potentially free of *E. faecalis* virulence factors. Clinical *E. faecalis* strains may not only be responsible of enterococcal infections in hospitalized patients with underlying conditions representing a wide spectrum of severity of illness and immune modulation but also, quite surprisingly, producers of bovine milk-derived bioactive peptides.

The results of this work strengthen the healthy connotations of the presence of *E. faecalis* strains producers of bioactive peptides in bovine milk-derived products, their role as beneficial commensals in the gastrointestinal tract of healthy humans, and their potential role as probiotics. Further studies should evaluate the production by active *E. faecalis* strains of bioactive peptides derived from their growth on other meat, fish, and plant sources. We may also envisage that *E. faecalis* strains of different origins and devoid, by using genetic engineering techniques, of most virulence factors could be evaluated for the production of food-derived bioactive peptides of potential interest to the food industry, in medical applications, and in the animal production field. Experiences would also be performed to identify the *E. faecalis* activities responsible of the production of bovine milk-derived hydrolysates with ACE-IA, due to the production of ACE-IP, and the production of antimicrobial peptides (AP) due to still uncharacterized AP-fragments (AP-F).

3.5. ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Tracy Eaton, Institute of Food Research, Norwich (UK) for providing strains. This work was partially supported by projects AGL2009-08348 and AGL2011-24643 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN), and CENIT (2006-2009) from the Ministerio de Industria, Turismo y Comercio y Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (MITC-CDTI). Funding by grants GR35-10A from the Banco de Santander Central Hispano-Universidad

Complutense de Madrid (BSCH-UCM) and S2009/AGR-1489 from the Comunidad de Madrid (CAM) is also acknowledged. L. Gútiérrez holds a fellowship (FPU) from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC), Spain.

3.6. REFERENCES

- Arias, C. A., and Murray, B. E. (2012). The rise of *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 10:266-278.
- Borrero, J., Jiménez, J. J., Gútiérrez, L., Herranz, C., Cintas, L. M., and Hernández, P. E. (2011). Protein expression vector and secretion signal peptide optimization to drive the production, secretion, and functional expression of the bacteriocin enterocin A in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 156:76-86.
- Bourgogne, A., Hilsenbeck, S. G., Dunne, G. M., and Murray, B. E. (2006). Comparison of OG1RF and an isogenic *fsrB* isogenic deletion mutant by transcriptional analysis: the *Fsr* system of *Enterococcus faecalis* is more than an activator of gelatinase and serine protease. *J. Bacteriol.* 188:2875-2884.
- Campbell, D. J. (2003). The renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35:784-791.
- Cat, A. N. D., and Toyuz, R. M. (2011). A new look at the renin-angiotensin system-focusing on the vascular system. *Peptides* 32:2141-2150.
- Chaves-López, C., Serio, A., Matruscelli, M., Papparella, A., Osorio-Cadavid, E., and Suzzi, G. (2011). Microbiological characteristics of kumis, a traditional fermented Colombian milk, with particular emphasis on enterococci population. *Food Microbiol.* 28:1041-1047.
- Chen, Z. Y., Peng, C., Jiao, R., Wong, Y. M., Yang, N., and Huang, Y. (2009). Anti-hypertensive nutraceuticals and functional foods. *J. Agric. Food Chem.* 57:4485-4499.
- Citti, R. (2005). *Ph.D. Thesis*. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, Spain.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 16th informational supplement. M100-S16. Wayne, PA: CLSI, 2009.
- Coburn, P. S., Pillar, C. M., Jett, B. D., Haas, W., and Gilmore, M. S. (2004). *Enterococcus faecalis* senses target cells and in response expresses cytolysin. *Science* 306:2270-2272.
- Coburn, P. S., Baghdadyan, A. S., Dolan, G. T., and Shankar, N. (2007). Horizontal transfer of virulence genes encoded on the *Enterococcus faecalis* pathogenicity island. *Mol. Microbiol.* 63:530-544.
- Contreras, M. M., Carrón, R., Montero, M. J., Ramos, M., and Recio, I. (2009). Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *Int. Dairy J.* 19:566-573.
- Coque, T. M., Seetulsingh, P., Singh, K. V., and Murray, B. E. (1998). Application of molecular techniques to the study of nosocomial infections caused by enterococci. In: Woodford, N., & Johnson, A. (Eds.), in *Methods in Molecular Medicine*, Vol. 15: Molecular Bacteriology: Protocols and Clinical Applications. Humana Press, Totowa, NJ, USA, (pp. 469-493).
- Domann, E., Hain, T., Ghai, R., Billon, A., Kuenne, C., Zimmermann, K., Chakraborty, T. (2007). Comparative genomic analysis for the presence of potential enterococcal virulence factors in the probiotic *Enterococcus faecalis* strain Symbioflor 1. *Int. J. Med. Microbiol.* 297:533-539.

- Dupré, I., Zanetti, S., Schito, A. M., Fadda, G., and Secchi, L. A. (2003). Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *J. Med. Microbiol.* 52:491-498.
- Eaton, T. J., and Gasson, M. J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1628-1635.
- Franz, C. M. A. P., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., and Gálvez, A. (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 151:125-140.
- Galloway-Peña, J., Roh, J. H., Latorre, M., Qin, X., and Murray, B. E. (2012). Genomic and SNP analyses demonstrate a distant separation of the hospital and community-associated clades of *Enterococcus faecium*. *PLoS ONE* 7(1), e31187. doi:10.1371/journal.pone.0030187.
- Gobbetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffredi, F., and Addeo, F. (2000). Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3898-3904.
- Gómez-Ruiz, J. A., Ramos, M., and Recio, I. (2002). Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *Int. Dairy J.* 12:697-706.
- Gómez-Sala, B. (2006). *M.Sc. Thesis*. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, Spain.
- Hartmann, R., and Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18:163-169.
- Hayes, M., Stanton, C., Slattery, H., O'Sullivan, O., Hill, C., Fitzgerald, G. F., and Ross, R. P. (2007). Casein fermentate of *Lactobacillus animalis* DPC6134 contains a range of novel propeptide angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:4658-4667.
- Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M., and Recio, I. (2004). Application of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the identification of biologically active peptides produced by milk fermentation and simulated gastrointestinal digestion. *J. Chromatogr. A* 17:107-114.
- Hernández-Ledesma, B., Contreras, M. M., and Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods. *Adv. Colloid Interface Sci.* 165:23-35.
- Kilpi, E. E. R., Kahala, M. M., Steele, J. L., Pihlanto, A. M., and Joutsjoki, V. V. (2007). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in milk fermented by wild-type and peptidase-deletion derivatives of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *Int. Dairy J.* 17:976-984.
- Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: from science to applications. *J. Funct. Foods* 1:77-87.
- Korhonen, H., and Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *Int. Dairy J.* 16:945-960.
- Ladero, V., Fernández, M., Calles-Enríquez, M., Sánchez-Llana, E., Cañedo, E., Martín, M. C., and Álvarez, M. A. (2012). Is the production of the biogenic amines tyramine and putrescine a species-level trait in enterococci? *Food Microbiol.* 30:132-138.
- López Expósito, I., and Recio, I. (2008). Protective effect of milk peptides: antibacterial and antitumor properties. *Adv. Exp. Med. Biol.* 606:271-293.

- Martín, M., Gutiérrez, J., Criado, R., Herranz, C., Cintas, L. M., and Hernández, P. E. (2006). Genes encoding bacteriocins and their expression and potential virulence factors of enterococci isolated from wood pigeons (*Columba palumbus*). *J. Food Prot.* 69:520-531.
- Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., Recio, I., and Hernández-Ledesma, B. (2012). Antihypertensive peptides from proteins: a review. *Food Funct.* 3:350-361.
- Meisel, H., Walsh, D. J., Murray, B., and FitzGerald, R. J. (2006). ACE inhibitory peptides. In: Yoshimori M, Shahidi F (Ed.), *Nutraceutical proteins and peptides in health and disease*, CRC Taylor and Francis: Boca Raton, Florida. (p 269-315).
- Miguel, M., Recio, I., Ramos, M., Delgado, M. A., and Aleixandre, M. A. (2006). Antihypertensive effects of peptides obtained from *Enterococcus faecalis*-fermented milk in rats. *J. Dairy Sci.* 89:3352-3359.
- Mills, S., Ross, R. P., Hill, C., Fitzgerald, G. F., and Stanton, C. (2011). Milk intelligence: mining milk for bioactive substances associated with human health. *Int. Dairy J.* 21:377-401.
- Minervini, F., Algaron, F., Rizzello, C. G., Fox, P. F., Monnet, V., and Gobbetti, M. (2003). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5297-5305.
- Muguerza, B., Ramos, M., Sánchez, E., Manso, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A., Delgado, M. A., and Recio, I. (2006). Antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk. *Int. Dairy J.* 16:61-69.
- Muñoz-Atienza, E., Landeta, G., de las Rivas, B., Gómez-Sala, B., Muñoz, R., Hernández, P. E., Cintas, L. M., and Herranz, C. (2011). Phenotypic and genetic evaluations of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from fish and fish products. *Int. J. Food Microbiol.* 146:212-216.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S., and Takano, T. (1995). Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *J. Dairy Sci.* 78:777-783.
- Nakayama, J., Kariyama, R., and Kumon, H. (2002). Description of a 23.9-Kilobase chromosomal deletion containing a region encoding *fsr* genes which mainly determines the gelatinase-negative phenotype of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* in urine. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3152-3155.
- Nielsen, M. S., Martinussen, T., Flambard, B., Sørensen, K. I., and Otte, J. (2009). Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: effect of bacterial strains, fermentation pH, and storage time. *Int. Dairy J.* 19:155-165.
- Ogier, J. C., and Serror, P. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126:291-301.
- Otte, J., Lenhard, T., Flambard, B., and Sørensen, K. I. (2011). Influence of fermentation temperature and autolysis on ACE-inhibitory activity and peptide profiles of milk fermented by selected strains of *Lactobacillus helveticus* and *Lactococcus lactis*. *Int. Dairy J.* 21:229-238.
- Pessione, A., Lamberti, C., Coccolin, L., Campolongo, S., Grunau, A., Giubergia, S., Eberl, L., Riedel, K., and Pessione, E. (2012). Different protein expression profiles in cheese and clinical isolates of *Enterococcus faecalis* revealed by proteomic analysis. *Proteomics* 12:431-447.

- Phelan, M., and Kerins, D. (2011). The potential role of milk-derived peptides in cardiovascular disease. *Food Func.* 2:153-167.
- Pihlanto, A., Virtanen, T., and Korhonen, H. (2010). Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. *Int. Dairy J.* 20:3-10.
- Pillar, C. M., and Gilmore, M. S., (2004). Enterococcal virulence-pathogenicity island of *Enterococcus faecalis*. *Front. Biosci.* 9:2335-2346.
- Quirós, A., Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Amigo, L., and Recio, I. (2005). Angiotensin converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir. *J. Dairy Sci.* 88:3480-3487.
- Quirós, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A., and Recio, I. (2007). Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *Int. Dairy J.* 17:33-41.
- Quirós, A., Contreras, M. M., Ramos, M., Amigo, L., and Recio, I. (2009). Stability to gastrointestinal enzymes and structure-activity relationship of β -casein-peptides with antihypertensive properties. *Peptides* 30:1848-1853.
- Regazzo, D., Da Dalt, L., Lombardi, A., Andrighetto, A., Negro, A., and Gabai, G. (2010). Fermented milks from *Enterococcus faecalis* TH563 and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LA2 manifest different degrees of ACE-inhibitory and immunomodulatory activities. *Dairy Sci. Technol.* 90:469-476.
- Rival, S. G., Boeriu, C. G., and Wichers, H. J. (2001). Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *J. Agric. Food Chem.* 49:295-302.
- Ruiz-Garbajosa, P., Bonten, M. J., Robinson, D. A., Top, J., Nallapareddy, S. R., Torres, C., Coque, T. M., Canton, R., Baquero, F., Murray, B. E., del Campo, R., and Willems, R. J. L. (2006). Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination. *J. Clin. Microbiol.* 44:2220-2228.
- Sánchez, J., Basanta, A., Gómez-Sala, B., Herranz, C., Cintas, L. M., and Hernández, P. E. (2007). Antimicrobial and safety aspects and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Int. J. Food Microbiol.* 117:295-305.
- Sánchez, D., Kassan, M., Contreras, M. M., Carrión, R., Recio, I., Montero, M. J., and Sevilla, M. A. (2011). Long-term intake of a milk casein hydrolysate attenuates the development of hypertension and involves cardiovascular benefits. *Pharmacol. Res.* 63:398-404.
- Sentandreu, M. A., and Toldrá, F. (2006). A fluorescence-based protocol for quantifying angiotensin-converting enzyme activity. *Nat. Protoc.* 1:2423-2427.
- Shankar, N., Lockett, C. V., Baghdayan, A. S., Drachenberg, C., Gilmore, M. S., and Johnson, D. E. (2001). Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infect. Immun.* 69:4366-4372.
- Silva Lopes, M. F., Simoes, A. P., Tenreiro, R., Figueiredo Marques, J. J., and Barreto Crespo, M. T. (2006). Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. *Int. J. Food Microbiol.* 112:208-214.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., and Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by

- pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33:2233-2239.
- van Schaik, W., and Willems, R. J. L. (2010). Genome-based insights into the evolution of enterococci. *Clin. Microbiol. Infect.* 16:527-532.
- Willems, R. J. L., Hanage, W. P., Bessen, D. E., and Feil, E. J. (2011). Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 35:872-900.
- Yamamoto, N., Akino, A., and Takano, T. (1994) Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.* 77:917-922.

CAPÍTULO *CHAPTER*

4

**Control de la lisis celular de cepas
recombinantes de *Lactococcus lactis*
mediada por la enterolisina A y
producción de hidrolizados lácteos
derivados de leche desnatada de vaca
con actividad inhibidora de la ECA**

***Controlled enterolysin A-mediated lysis
and production of angiotensin converting
enzyme (ACE)-inhibitory bovine skim
milk hydrolysates by recombinant
*Lactococcus lactis****

ABSTRACT

Cloning of the enterolysin A (EnIA) gene (*enIA*) from *Enterococcus faecalis* DAC9 into the pMSP3545-derived pMLG2-protein expression vector encoding EnIA under control of the inducible P_{nisA} promoter has permitted the heterologous expression and controlled release of EnIA by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 and *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403. The nisin-induced expression of *enIA* by *L. lactis* NZ9000 (pMLG2) and *L. lactis* IL1403 (pMLG2), grown in GM17 or bovine skim milk (BSM), originated a noticeable reduction of the optical density (OD₆₀₀) of the cultures and death of the growing cells. However, a high angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitory activity (ACE-IA) was only observed in the BSM-derived hydrolysates of *L. lactis* IL1403 (pMLG2) after 48 h-induction with nisin. Analysis of these hydrolysates by RP-HPLC-MS/MS permitted the identification of major peptide fragments with known ACE-IA or sharing at least three C-terminal residues with those displaying ACE-IA.

4.1. INTRODUCTION

Lactic acid bacteria (LAB) hydrolyse proteins, mainly caseins, into peptides and amino acids which are used as nitrogen sources for their growth. However, in addition to their role in bacterial growth, the LAB proteolytic enzymes also contribute to the organoleptic properties of the fermented products and promote the release of bioactive peptides with antimicrobial, antioxidant, antithrombotic, antihypertensive, immunomodulatory, opioid, and antiproliferative activities, among others (Gobbetti et al., 2004; Korhonen and Pihlanto, 2006; Millset et al., 2011). Among the compounds derived from dietary proteins, those with angiotensin-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity (ACE-IA), known as ACE-inhibitory peptides (ACE-IP), are of great interest for their potential use in the treatment of elevated blood pressure and associated cardiovascular events (Phelan and Kerins, 2011). Therefore, ACE-IP derived from food substrates are of interest in the development of functional foods with antihypertensive properties (Hernández-Ledesma et al., 2011; Martínez-Maqueda et al., 2012).

LAB are able to produce ACE-IP during growth on milk by the action of extracellular proteases, cell wall proteinases and intracellular peptidases (Otte et al. 2011). For production of fermented milk with ACE-IA, thermophilic and mesophilic LAB from the genera *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* and *Streptococcus* have been evaluated (Minervini et al., 2003; Muguerza et al., 2006; Kilpi et al., 2007). Fermentation conditions and the proteolytic activity of the specific LAB strains seem to modulate the ACE-IA and the production of ACE-IP (Nielsen et al., 2009; Otte et al. 2011). Furthermore, the autolysis of LAB starters and release of their proteolytic system has been linked to debittering and flavour development in cheese (Crow et al., 1995; Smit et al., 2005). Moreover, this process could also influence the production of ACE-IP by LAB during their growth on different food substrates. However, the rate and level of autolysis by LAB is essentially uncontrolled and strain dependent, involves different enzymes known as peptidoglycan hydrolases, and starts after exponential LAB growth has finished (Buist et al., 1997). In this context, the design of externally stimulated inducible lysis systems could provide an attractive approach for the fine control of LAB cell lysis. In this respect, a number of studies have been performed to increase the extracellular production of intracellular hydrolytic enzymes and the rate and level of lysis of the sensitive *L. lactis* strains (Guldtfeld et al., 2001; Tuler et al., 2002). Recombinant DNA methodologies have been developed to induce the controlled lysis of *L. lactis* by overproduction of its major autolysin (AcmA) or by induction of the holin-lysin (*lytPR*) genes of the lactococcal bacteriophage r1t (Buist et al., 1997; Sanders et al., 1997). Improved and specialized *L. lactis* starter cultures have been also obtained from the construction of lactococcal strains that express the holin (*lytH*) and lysin (*lytA*) genes of bacteriophage ΦUS3 or the cell-wall degrading bacteriocin enterolysin A (*enlA*) gene, permitting the controlled lysis of the recombinant strains and their effect on accelerating cheese ripening (de Ruyter et al., 1997; Hickey et al., 2004).

The enterolysin A (EnlA) is a class III heat-labile bacteriocin produced by *E. faecalis* which breaks down the cell wall of Gram-positive bacteria including the sensitive *L. lactis* cells (Hickey et al., 2003; Nilsen et al., 2003). The structural EnlA gene (*enlA*) encodes a 343 amino acid preprotein, with a Sec-dependent peptide of 27 amino acids and the mature EnlA of 316 amino

acids with a calculated molecular mass of 34,501 Da (Nilsen et al., 2003). Accordingly, the purpose of this study was the construction of *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 and *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 strains heterologously producing EnIA to induce their controlled lysis and the release of intracellular enzymes which could be responsible of a higher ACE-IA, due to the production of ACE-IP, during growth of the recombinant strains in bovine skim milk (BSM).

4.2. MATERIALS AND METHODS

4.2.1. Bacterial strains, plasmids, and growth conditions. *Enterococcus faecalis* DAC9 (Sánchez et al., 2007), used as the source of the enterolysin A (EnIA) gene (*enIA*) was grown in MRS broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) at 32 °C. This gene has a nucleotide sequence identical to that encoded by *E. faecalis* LMG 233 (GenBank nº AF249740). *Escherichia coli* JM109 cells (Promega Biotech Ibérica, Madrid, Spain) used for primary selection of the recombinant plasmids was grown in Luria-Bertani medium (LB) (Oxoid) with agitation at 37 °C. *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 (Kuipers et al., 1998) and *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 (Chopin et al., 1984), used as the recombinant hosts for production of EnIA, were grown in the M17 medium (Oxoid) supplemented with 0.5% (w/v) glucose (GM17) at 32 °C or in pasteurized (63 °C for 30 min) bovine skim milk (BSM) obtained from a local supplier (Priégola, Madrid, Spain). Agar plates were made by addition of 1.5% (w/v) agar (Oxoid) to the liquid media. Erythromycin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added to the *E. coli* cultures at 350 µg/ml and to the lactococcal cultures at 5 µg/ml.

4.2.2. Basic genetic techniques and enzymes. Total genomic DNA from *E. faecalis* DAC9 was isolated using the Wizard® DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). Plasmid DNA from *E. coli* JM109 was isolated using the High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Diagnostics, East Sussex, UK). DNA restriction enzymes were purchased from New England BioLabs (Beverly, MA, USA). Ligations were performed with the T4 DNA ligase (Roche) at 16 °C overnight. Competent *E. coli* JM109 cells were transformed as recommended by the supplier. Electrocompetent *L. lactis* cells were transformed according to the method of Holo and Nes (1989) with a Gene Pulser™ and Pulse Controller apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

4.2.3. PCR amplification and nucleotide sequencing. Oligonucleotide primers were obtained from Sigma-Genosys Ltd. (Cambridge, UK). PCR-amplifications were performed in 50 µl reaction mixtures containing 1 µl of purified DNA, 70 pmol of each primer, and 1 U of Platinum® Pfx DNA Polymerase (Invitrogen S.A., Barcelona, Spain) with proofreading 3' to 5' exonuclease activity in a DNA thermal cycler Techgene (Techne, Cambridge, UK). The PCR-generated fragments were purified by the NucleoSpin® Extract II Kit (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Germany) for cloning and nucleotide sequencing. Nucleotide sequencing of purified PCR products was done using the ABI PRISM® BigDye™ Terminator cycle sequence reaction kit and the automatic DNA sequencer ABI PRISM, model 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) at the DNA Sequencing Service Sistemas Genómicos (Valencia, Spain).

4.2.4. Construction of the pMSP3545-derived recombinant plasmid pMLG2. Primers PMLE-F (5'-ATAAACTCATCATGAAAAATATTTTACTTTCTATTCTAGGGGTATTATC-3') and PMLE-R (5'-ATAAGTTTCTAGATATTTAAAATGGATTGACTGTGAAATACCTATTTG-3'), with sites for restriction enzymes underscored, were used for PCR amplification from total genomic DNA of *E. faecalis* DAC9 of a 1,057-bp *Bsp*HI/*Xba*I fragment containing *enlA*. The purified PCR fragment was digested with *Bsp*HI and *Xba*I and inserted into the translational insert site of *nisA* in pMSP3545, previously digested with *Nco*I and *Xba*I. The ligation mixtures were used to transform competent *E. coli* JM109 cells under erythromycin (Em) selection. The plasmid derivative pMLG2 containing the correct sequence of *enlA*, as confirmed by DNA sequencing, was further purified and used to transform competent *L. lactis* NZ9000 and *L. lactis* IL1403 cells.

4.2.5. Production of enterolysin A by the recombinant *L. lactis* cells. The recombinant *L. lactis* NZ9000 (pMLG2) and *L. lactis* IL1403 (pMLG2) cells were inoculated in GM17 broth or BSM, and incubated at 32 °C for 24 h. The grown cultures were re-inoculated (4%, v/v) into GM17 and BSM and incubated at 32 °C to an optical density (OD₆₀₀) of approximately 0.5 (corresponding to 10⁷-10⁸ cfu/ml). The grown cultures were then induced with 40 ng/ml of nisin (Sigma) or left untreated. The same growth and inducing conditions were used for the control cultures *L. lactis* NZ9000 (pMSP3545) and *L. lactis* IL1403 (pMSP3545). The OD₆₀₀ of the cultures grown on GM17 was measured every 30 min over a 3 h period. Bacterial counts of the cultures grown on either MRS or BSM were determined on MRS plates under appropriate selection conditions after incubation at 32 °C for 24 h. Cell survival was expressed as the percentage of viable cells or number of colony forming units per milliliter (cfu/ml).

4.2.6. Determination of the ACE-inhibitory activity (ACE-IA) of the BSM-derived culture supernatants. Culture samples of the recombinant *L. lactis* grown on BSM after induction with nisin were collected and centrifuged at 8.000 x *g* for 10 min. The supernatants were filtered through 0.20 µm pore-size filters (Whatman Int. Ltd., Maidstone, UK) and stored at -20 °C until further use. The angiotensin-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity (ACE-IA) of the samples was determined by a fluorometric assay (Sentandreu and Toldrá, 2006), with modifications (Quirós et al., 2009). The fluorescence of the samples was measured in a Multiscan Microplate Fluorimeter (FLUOstar optima, BMG Labtech, Offenburg, Germany). The ACE-IA was expressed as the percentage of inhibition of the ACE activity by the centrifuged milk-derived samples. Three replicas were used to estimate the ACE-IA of the samples.

4.2.7. Analysis of the BSM-derived culture supernatants by reversed-phase high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (RP-HPLC-MS/MS). The RP-HPLC-MS/MS analysis of the samples obtained after growth of the selected recombinant *L. lactis* strains in BSM was performed on an Agilent 1100 HPLC System (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) with column HiPore® (RP318 C₁₈ column 250 x 4.6 mm, 5 µm of particle size; Bio-Rad, Richmond, CA, USA). The HPLC system was connected on-line to an Esquire 3000 quadrupole ion trap (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) equipped with an electrospray ionization source, as previously described (Hernández-Ledesma et al., 2004). Filtered milk samples were adjusted to pH 4.0, centrifuged at 8.000 x *g* for 10 min and 50 µl of these water-soluble extracts were injected. Different spectra were recorded over the mass/charge

(m/z) range 100–1,500. About 5 spectra were averaged in the MS and in the MS(n) analyses. The signal threshold to perform auto MS(n) analyses was 10,000 (*i.e.*, 5% of the total signal) and the precursor ions were isolated within a range of 4.0 m/z and fragmented with a voltage ramp from 0.35 to 1.4 V. The m/z spectral data was transformed to mass values by using the Data Analysis™ (version 3.0; Bruker Daltonik) control program. The BioTools (version 2.1; Bruker Daltonik) was used to process the MS(n) spectra for peptide identification and sequencing.

4.3. RESULTS AND DISCUSSION

Many LAB produce ACE-IP with ACE-IA during their growth in milk (Nielsen et al., 2009; Otte et al., 2011). Milk products with ACE-IP can be produced by enzymatic hydrolysis of precursor proteins or by fermentation of milk with LAB cultures. The proteolytic system of *L. lactis* hydrolyzes proteins into amino acids in three steps: casein is hydrolyzed by cell-envelope-bound proteinases (CEP or PrtP) into peptides of various lengths, fragmented peptides are transported into the cells by specific oligopeptide transport systems, and they are further hydrolyzed to smaller peptides and amino acids by a variety of peptidases with distinct and partly overlapping specificities (Lamarque et al., 2001; Savijoki et al., 2006; Guo et al., 2009; Muñoz-Tamayo et al., 2011). Although *L. lactis* is not generally considered to be very proteolytic, some strains are considered more proteolytic than normal for this species (Nielsen et al., 2009; Pihlanto et al., 2010; Otte et al., 2011), and large variations in overall proteolysis, proteolytic activities and peptide utilization has been also observed among wild *L. lactis* strains (Picón et al., 2010). It is also known that some ACE-IP are products of extracellular proteases alone, whereas others are the result of both proteinases and peptidases (Nielsen et al., 2009). Furthermore, the controlled lysis of the *L. lactis* cultures used in milk fermentations may lead to release of peptidases into the milk matrix which would degrade some of the primary peptides formed by the extracellular proteases into more potent ACE-IP (Otte et al., 2011).

L. lactis is an industrial microorganism with GRAS (Generally Recognized as Safe) and QPS (Qualified Presumption of Safety) status and is increasingly used in modern biotechnological applications. *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 is a plasmid-free derivative of IL594 (Chopin et al., 1984) and *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 is a derivative of MG1363, created by integration of the *nisKR* genes into *pepN* for use in the nisin-controlled gene expression (NICE) system for protein overexpression (Kuipers et al., 1998). Both are considered as model strains for protein expression and other physiological studies (Linares et al., 2010). For the controlled lysis of the selected *L. lactis* cells the gene (*enlA*) encoding EnlA with a higher cell-wall lytic activity than that of the major autolysin (AcmA) of *L. lactis* and several holin and lysin enzymes produced by bacteriophages (Hickey, Ross & Hill, 2004), was cloned into the expression vector pMSP3545, a shuttle vector with replication in *E. coli*, *L. lactis* and other LAB (Bryan et al., 2000). Plasmid pMSP3545 is an improved vector for NICE protein expression in Gram-positive bacteria that contains the *P_{nisA}* and the two-component signaling mechanism (NisR and NisK) for activating transcription from *P_{nisA}* in the presence of nisin (Kuipers et al., 1998; Bryan et al., 2000). Although production of EnlA by the NICE system during protein expression may be lower by pMSP3545-derivatives than by the pNZ8048-derivatives due to the low copy number of the pAmb1 origin of replication of pMSP3545 (Kim and Mills, 2007), the pMSP3545-derivatives transform efficiently a

wider range of *L. lactis* and other LAB strains without the requirement of the *niskR* signal transduction genes integrated into their chromosomes (Mierau et al., 2005; Borrero et al., 2011).

In this work, the *enlA* from *E. faecalis* DAC9 (Sánchez et al., 2007) was cloned into pMSP3545 to obtain pMLG2, coding for mature EnlA. The construction of the *L. lactis* NZ9000 (pMSP3545), *L. lactis* NZ9000 (pMLG2), *L. lactis* IL1403 (pMSP3545), and *L. lactis* IL1403 (pMLG2) strains permitted the evaluation of the production and functional expression of EnlA throughout reduction in the optical density (OD₆₆₀) of the cultures, in the absence or presence of nisin, during their growth in GM17. The addition of nisin to the *L. lactis* NZ9000 (pMLG2) and *L. lactis* IL1403 (pMLG2) cultures grown in GM17 resulted in a noticeable reduction of their OD₆₆₀, as compared to that of the *L. lactis* NZ9000 (pMSP3545) and *L. lactis* IL1403 (pMSP3545) control cultures (**Fig. 4.1**). The *L. lactis* NZ9000 (pMLG2) and *L. lactis* IL1403 (pMLG2) cultures showed an 82% to 85% and a 69% to 80% reduction of its OD₆₆₀, respectively, after 90- and 180-min induction with nisin. Similarly, cell death was 93% to 99% and 87% to 99% for the *L. lactis* NZ9000 (pMGL2) and the *L. lactis* IL1403 (pMLG2) cells, respectively, after 90- and 180-min of induction with nisin. Surviving cells may represent those resistant to EnlA or unable to express EnlA at a high level.

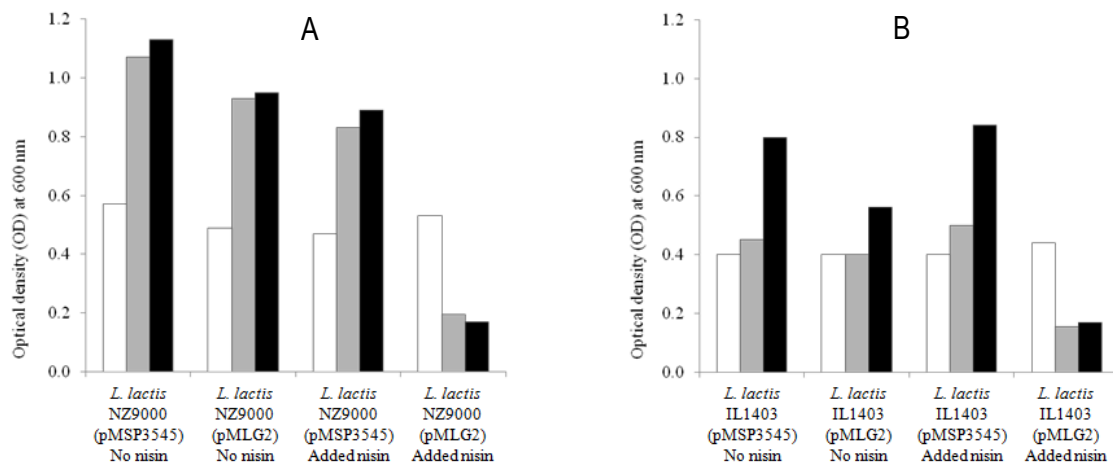


Fig. 4.1. Reduction of the optical density of the recombinant *L. lactis* NZ9000 (A) and *L. lactis* IL1403 cultures (B), after induction with nisin during growth in GM17. Growth after induction with nisin was measured at (□) 0 min, (■) 90 min and (■) 180 min.

Subsequently, experiences were performed to determine whether the controlled expression of EnlA by the recombinant *L. lactis* NZ9000 and *L. lactis* IL1403 cultures could result in cell lysis during their growth in BSM. Growing cultures in BSM were induced with nisin and cell growth and survival were determined after 3- to 48-h of the induction. The addition of nisin to BSM-grown cultures resulted in a significant decrease in the number of *L. lactis* cells transformed with pMLG2 as compared to those transformed with pMSP3545, and in a significant reduction in the percentage of *L. lactis* NZ9000 (pMLG2) and *L. lactis* IL1403 (pMLG2) surviving cells (**Fig. 4.2**). The reduction in the number of viable cells was evident after 9 h growth of the former cultures in BSM while only 0.07% and 0.15% of the *L. lactis* NZ9000 (pMLG2) and *L. lactis* IL1403 (pMLG2)

cells, respectively, were viable after 24 h of induction with nisin. The longer time required for the functional expression of EnIA in BSM as compared to the GM17 medium may be explained since protein production with the NICE system depends on the medium composition and fermentation parameters (Mierau et al., 2005; Berlec et al., 2008). Among the BSM components, the calcium divalent ions are reported to inhibit the action of nisin (Houlihan and Russell, 2006). For this reason, in this work the amount of nisin as the inducer was increased to 40 ng/ml although 10 ng/ml is the recommended amount for most experiences (Mierau et al., 2005).

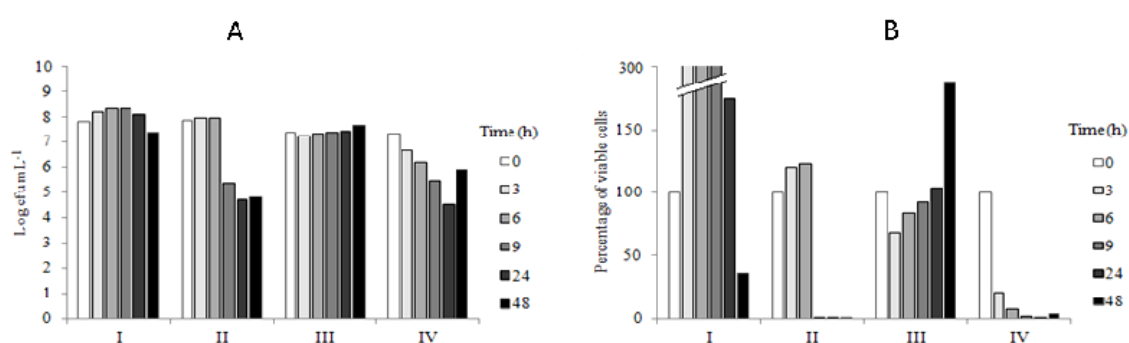


Fig. 4.2. Growth of *L. lactis* NZ9000 (pMSP3545) (I), *L. lactis* NZ9000 (pMLG2) (II), *L. lactis* IL1403 (pMSP3545) (III) and *L. lactis* IL1403 (pMLG2) (IV) cultures, after induction with nisin during growth in bovine skim milk (BSM), and expressed as colony forming units per millilitre (A) and percentage of viable cells (B). Data are mean from two independent determinations in triplicate.

Since the controlled release and heterologous expression of EnIA by the recombinant *L. lactis* cultures grown on BSM was effective, of interest was to determine the ACE-IA of the BSM-hydrolysates generated from the release of intracellular proteinases and peptidases by the lysed cells. The ACE-IA of these hydrolysates was undetectable after 24 h of induction while after 48 h of induction a higher ACE-IA was detected in the supernatants of the *L. lactis* IL1403 (pMLG2) cultures as compared to that of the controls and the *L. lactis* NZ9000 (pMLG2) cells (**Table 4.1**).

Table 4.1. ACE-inhibitory activity (ACE-IA)^a of supernatants of recombinant *L. lactis* strains grown in bovine skim milk (BSM).

Strain	Time (h) after induction		
	0	24	48
<i>L. lactis</i> NZ9000 (pMSP3545)	NA	NA	19.5
<i>L. lactis</i> NZ9000 (pMLG2)	NA	NA	17.7
<i>L. lactis</i> IL1403 (pMSP3545)	NA	NA	25.9
<i>L. lactis</i> IL1403 (pMLG2)	NA	NA	54.6

^a ACE-inhibitory activity expressed as percentage of inhibition of ACE. Data are mean from two independent determinations in triplicate.

NA: No activity.

The evaluation by RP-HPLC of the peptide profiles of the BSM-derived hydrolysates from *L. lactis* NZ9000 (pMLG2) and *L. lactis* IL1403 (pMLG2) revealed a larger number of peptide fractions in the hydrolysates of the latter than in the former strain after 48 h induction (**Fig. 4.3**). Differences in ACE-IA and peptide profiles in the BSM-derived hydrolysates could be ascribed to genomic differences among *L. lactis* NZ9000 and *L. lactis* IL1403 (Bolotin et al., 2001; Linares et al., 2010). In this context, pangenome comparative hybridization analysis have identified variations in the proteolytic system of LAB, suggesting that proteolytic activities may differ not only between species but also between different *L. lactis* strains (Liu et al., 2010). Furthermore, cloning of *nisRK* in the *pepN* site of *L. lactis* NZ9000 (Kuipers et al., 1998) eliminates production of the intracellular peptidase *PepN* and, probably, other peptidases due to potential polar genetic effects. In this respect, cheeses produced with *L. lactis* strains overexpressing *pepN* or *pepC* were characterized by good scores in flavour preferences and low bitterness (Guldfeldt et al., 2001).

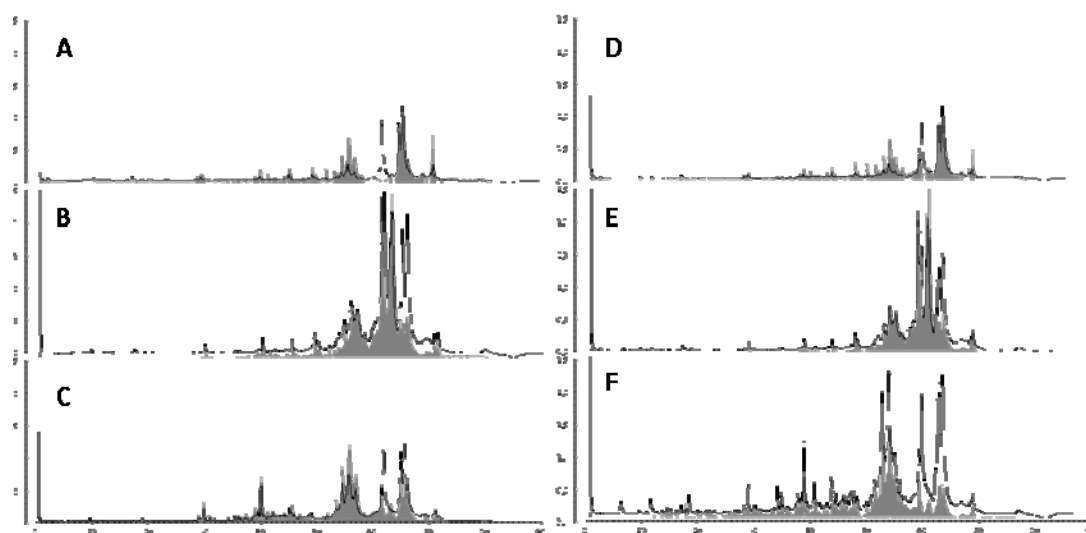


Fig. 4.3. Peptide profiles by RP-HPLC of the *L. lactis* NZ9000 (pMLG2) cultures after 0 (A), 24 (B) and 48 h (C) of induction with nisin, and of the *L. lactis* IL1403 (pMLG2) cultures after 0 (D), 24 (E) and 24 h (F) induction with nisin, during growth in bovine skim milk (BSM).

Further analysis by RP-HPLC-MS/MS of the major peptide fragments in the BSM-derived hydrolysates from *L. lactis* (pMLG2) after 48 h-induction with nisin indicated the presence of bovine β -casein-, bovine α_{s1} -casein- and bovine α_{s2} -casein-derived fragments (**Table 4.2**). Furthermore, some of the identified peptide fragments have been previously reported to show ACE-IA or share at least three C-terminal residues with those with ACE-IA (Cushman et al, 1977; Cheung et al., 1980). These identified peptide fragments with reported ACE-IA were EMPFPK [*f*(108-113)] and KEMPFPK [*f*(107-113)] derived from bovine β -casein, the peptides EVFGK [*f*(30-34)], NENLLRF [*f*(17-23)] and FVAPFPGEVFGK [*f*(24-34)] derived from bovine α_{s1} -casein, and the peptides KPWIQPK [*f*(191-197)] and AMKPWIQPKVIPYVRYL [*f*(189-207)] derived from bovine α_{s2} -casein (Karaki et al., 1990; Maeno et al., 1996; Quirós, et al., 2005; Fitzgerald and Murray, 2006; Hernández-Ledesma et al., 2011) (**Table 4.2**). Moreover, the peptide VKEAMAPK [β -casein, *f*(98-105)], previously reported as antioxidant (Rival et al., 2001), has been also

identified among the major peptides present in the BSM-derived hydrolysates from *L. lactis* (pMLG2).

Table 4.2. Major peptide fragments in the bovine skim milk (BSM)-derived hydrolysates of *L. lactis* IL1403 (pMLG2) after controlled release of EnIA.

Observed mass	Calculated mass ^a	Protein fragment	Peptide sequence	Previously described ACE-inhibitory peptides (ACE-IP) ^b
645.3	645.322	β -CN f(100-105)	EAMAPK	-----
747.4	747.363	β -CN f(108-113)	EMPFPK	EMPFPK
773.4	773.411	β -CN f(99-105)	KEAMAPK	-----
810.4	810.383	β -CN f(119-125)	FTESQSL	-----
872.6	872.486	β -CN f(98-105)	VKEAMAPK	-----
875.4	875.458	β -CN f(107-113)	KEMPFPK	EMPFPK
903.3	903.462	β -CN f(126-133)	TLTDVENL	-----
904.5	904.483	β -CN f(65-72)	PIHNSLPQ	-----
910.6	910.476	β -CN f(100-107)	EAMAPKHK	-----
2,282.9	2,282.217	β -CN f(85-105)	PPFLQPEVMGVSK VKEAMAPK	-----
578.3	578.306	α _{S1} -CN f(30-34)	EVFGK	FFVAPFPGVFGK
757.4	757.408	α _{S1} -CN f(17-22)	NENLLR	ENLLRF
835.4	835.444	α _{S1} -CN f(30-36)	EVFGKEK	-----
874.6	874.557	α _{S1} -CN f(1-7)	RPKHPIK	-----
904.5	904.483	α _{S1} -CN f(17-23)	NENLLRF	ENLLRF
975.5	975.507	α _{S1} -CN f(126-133)	FPKYPVEP	-----
1,198.6	1,198.603	α _{S1} -CN f(14-22)	EVLNENLLR	-----
1,236.5	1,236.654	α _{S1} -CN f(24-34)	FVAPFPEVFGK	FFVAPFPGVFGK
1,535.0	1,534.884	α _{S1} -CN f(1-13)	RPKHPIKHQGLPQ	-----
831.5	831.485	α _{S2} -CN f(175-181)	ALPQYLK	-----
895.5	895.528	α _{S2} -CN f(191-197)	KPWIQPK	MKPWIQPK
902.5	902.461	α _{S2} -CN f(182-188)	TVYQHQQ	-----
921.5	921.503	α _{S2} -CN f(166-172)	KISQRYQ	-----
2,331.2	2,330.334	α _{S2} -CN f(189-207)	AMKPWIQPKKVIPY VRYL	PYVRYL

^a Monoisotopic mass.

^b Previously described ACE-inhibitory peptides (ACE-IP) with ACE-IA or sharing, at least, three C-terminal residues with those found in this study.

4.4. CONCLUSIONS

The heterologous expression and controlled release of the cell wall degrading bacteriocin EnIA by *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 (pMLG2) and *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 (pMLG2) originated, during their growth in BSM, a large reduction in the number of viable cells. However, an ACE-IA higher than 50% was only observed in the 48 h-hydrolysates of the BSM-grown cultures of the recombinant *L. lactis* IL1403 (pMLG2). Analysis of the hydrolysates by RP-HPLC-MS/MS determined the existence of major ACE-IP with ACE-IA and one antioxidant peptide. In addition, the presence in the hydrolysates of bacterial metabolites with ACE-IA and other peptide fragments of yet unknown biological activity merits further research. Furthermore, the pMLG2 vector encoding EnIA could be useful for evaluation of the ACE-IA and production of ACE-IP

during the nisin-controlled lysis of many other pMLG2-transformed LAB strains during their growth in different food substrates.

4.5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their gratitude to Prof. G. M. Dunny, Department of Microbiology, University of Minnesota (Minneapolis, MN, USA), for supplying plasmid pMSP3545. This work was partially supported by project AGL2012-34829 from the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), by projects AGL2009-08348 and AGL2011-24643 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN), and by the CENIT project (2006-2009) from the MITC-CDTI. Funding by grants GR35-10A from the BSCH-UCM and S2009/AGR-1489 from the Comunidad de Madrid (CAM) are also acknowledged. L. Gútiez holds a fellowship (FPU) from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC), Spain.

4.6. REFERENCES

- Berlec, A., Tompa, G., Slapar, N., Fonović, U. P., Rogelj, I., and Strukelj, B. (2008). Optimization of fermentation conditions for the expression of sweet-tasting protein brazzein in *Lactococcus lactis*. *Let. Appl. Microbiol.* 46:227-231.
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarne, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D., and Sorokin, A. (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genom. Res.* 11:731-753.
- Borrero, J., Jiménez, J. J., Gútiez, L., Herranz, C., Cintas, L. M., and Hernández, P. E. (2011). Protein expression vector and secretion signal peptide optimization to drive the production, secretion, and functional expression of the bacteriocin enterocin A (EntA) in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 156:76-86.
- Bryan, E. M., Bae, T., Kleerebezem, M., and Dunny, G. M. (2000). Improved vectors for nisin-controlled expression in gram-positive bacteria. *Plasmid* 44:183-190.
- Buist, G., Karsens, H., Nauta, A., van Sinderen, D., Venema, G., and Kok, J. (1997). Autolysis of *Lactococcus lactis* caused by induced overproduction of its major autolysin, AcmA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2722-2728.
- Cheung, H. S., Wang, F. L., Ondetti, M. A., Sabo, E. F., and Cushman, D. W. (1980). Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *J. Biol. Chem.* 25:401-407.
- Chopin, M. C., Chopin, A., Moillo-Bott, A., and Langella, P. (1984). Two plasmid-determined restriction and modification systems in *Streptococcus lactis*. *Plasmid* 11, 260-263.
- Crow, V. L., Coolbear, T., Gopal, P. K., Martley, F. G., McKay, L. L., and Riepe, H. (1995). The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. *Int. Dairy J.* 5:855-875.
- Cushman, D. W., Cheung, H. S., Sabo, E. F., and Ondetti, M. A. (1977). Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. *Biochemistry* 16:5484-5491.
- de Ruyter, P. G., Kuipers, O. P., Meijer, W. C., and de Vos, W. M. (1997). Food-grade controlled lysis of *Lactococcus lactis* for accelerated cheese ripening. *Nat. Biotechnol.* 15:976-979.

- Fitzgerald, R., and Murray, B. A. (2006). Bioactive peptides and lactic fermentations. *Int. J. Dairy Technol.* 59:118-125.
- Gobbetti, M., Minervini, F., and Rizzello, C. G. (2004). Angiotensin-I-converting enzyme-inhibitory and microbial-bioactive peptides. *Int. J. Dairy Technol.* 57:173-187.
- Guldfeldt, L. U., Sørensen, K. I., Strøman, P., Behrndt, H., Williams, D., and Johansen, E. (2001). Effect of starter cultures with a genetically modified peptidolytic or lytic system on cheddar cheese ripening. *Int. Dairy J.* 11:373-382.
- Guo, Y., Pan, D., Zeng, X., and Tanokura, M. (2009). Purification and characterization of CEP from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. *Food Chem.* 112:533-538.
- Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M., and Recio, I. (2004). Application of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the identification of biologically active peptides produced by milk fermentation and simulated gastrointestinal digestion. *J. Chromatogr. A* 17:107-114.
- Hernández-Ledesma, B., Contreras, M. M., and Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods. *Adv. Colloid Interface Sci.* 165:23-35.
- Hickey, R. M., Twomey, D. P., Ross, R. P., and Hill, C. (2003). Production of enterolysin A by a raw milk enterococcal isolate exhibiting multiple virulence factors. *Microbiology* 149:655-664.
- Hickey, R. M., Ross, R. P., and Hill, C. (2004). Controlled autolysis and enzyme release in a recombinant lactococcal strain expressing the metalloendopeptidase Enterolysin A. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1744-1748.
- Holo, H., and Nes, I. F. (1989). High-frequency transformation by electroporation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:3119-3123.
- Houlihan, A. J., and Russell, J. B. (2006). The effect of calcium and magnesium on the activity of bovicin HC5 and nisin. *Curr. Microbiol.* 53:365-369.
- Karaki, H., Doi, K., Sugano, S., Uchiwa, H., Sugai, R., Murakami, U., and Takemoto, S. (1990). Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 96:367-371.
- Kilpi, E. E. R., Kahala, M. M., Steele, J. L., Pihlanto, A. M., and Joutsjoki, V. V. (2007). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in milk fermented by wild-type and peptidase-deletion derivatives of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *Int. Dairy J.* 17:976-984.
- Kim, J. H., and Mills, D. A. (2007). Improvement of a nisin-inducible expression vector for use in lactic acid bacteria. *Plasmid* 58:275-283.
- Korhonen, H., and Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *Int. Dairy J.* 16:945.
- Kuipers, O. P., de Ruyter, P. G., Kleerebezem, M., and de Vos, W. M. (1998). Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 64:15-21.
- Lamarque, M., Aubel, D., Piard, J., Gilbert, C., Juillard, V., and Atlan, D. (2011). The peptide transport system Opt is involved in both nutrition and environmental sensing during growth of *Lactococcus lactis* in milk. *Microbiology* 157:1612-1619.
- Linares, D. M., Kok, J., and Poolman, B. (2010). Genome sequences of *Lactococcus lactis* MG1363 (revised) and NZ9000 and comparative physiological studies. *J. Bacteriol.* 192:5806-5812.

- Liu, M., Bayjanov, J. R., Renckens, B., Nauta, A., and Siezen, R. J. (2010). The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC Genomics* 11:36.
- Maeno, M., Yamamoto, N., and Takano, T. (1996). Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.* 79:1316-1321.
- Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., Recio, I., and Hernández-Ledesma, B. (2012). Antihypertensive peptides from proteins: a review. *Food Funct.* 3:350-361.
- Mierau, I., Olieman, K., Mond, J., and Smid, E. J. (2005). Optimization of the *Lactococcus lactis* nisin-controlled gene expression system NICE for industrial applications. *Microb. Cell Fact.* 30:4-16.
- Mills, S., Ross, R. P., Hill, C., Fitzgerald, G. F., and Stanton, C. (2011). Milk intelligence: mining milk for bioactive substances associated with human health. *Int. Dairy J.* 21:377-401.
- Minervini, F., Algaron, F., Rizzello, C. G., Fox, P. F., Monnet, V., and Gobbetti, M. (2003). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5297-5305.
- Muguerza, B., Ramos, M., Sánchez, E., Manso, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A., Delgado, M. A., and Recio, I. (2006). Antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk. *Int. Dairy J.* 16:61-69.
- Muñoz-Tamayo, R., de Groot, J., Bakx, E., Wierenga, P. A., Gruppen, H., Zwietering, M. H., and Sijstma, L. (2011). Hydrolysis of β -casein by the cell-envelope-located P_I-type protease of *Lactococcus lactis*: a modelling approach. *Int. Dairy J.* 21:755-762.
- Nielsen, M. S., Martinussen, T., Flambard, B., Sørensen, K. I., and Otte, J. (2009). Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: Effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. *Int. Dairy J.* 19:155-165.
- Nilsen, T., Nes, I., and Holo, H. (2003). Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2975-2984.
- Otte, J., Lenhard, T., Flambard, B., and Sørensen, K. I. (2011). Influence of fermentation temperature and autolysis on ACE-inhibitory activity and peptide profiles of milk fermented by selected strains of *Lactobacillus helveticus* and *Lactococcus lactis*. *Int. Dairy J.* 21:229-238.
- Phelan, M., and Kerins, D. (2011). The potential role of milk-derived peptides in cardiovascular disease. *Food Funct.* 2:153-167.
- Picón, A., García-Casado, M. A., and Nuñez, M. (2010). Proteolytic activities, peptide utilization and oligopeptide transport systems of wild *Lactococcus lactis* strains. *Int. Dairy J.* 20:156-162.
- Pihlanto, A., Virtanen, T., and Korhonen, H. (2010). Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. *Int. Dairy J.* 20:3-10.
- Quirós, A., Contreras, M. M., Ramos, M., Amigo, L., and Recio, I. (2009). Stability to gastrointestinal enzymes and structure-activity relationship of β -casein-peptides with antihypertensive properties. *Peptides* 30:1848-1853.
- Rival, S. G., Boeriu, C. G., and Wichers, H. J. (2001). Caseins and caseinhydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *J. Agric. Food Chem.* 49:295-302.

- Sánchez, J., Basanta, A., Gómez-Sala, B., Herranz, C., Cintas, L. M., and Hernández, P. E. (2007). Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Int. J. Food Microbiol.* 117:295-305.
- Sanders, J. W., Venema, G., and Kok, J. (1997). A chloride-inducible gene expression cassette and its use in induced lysis of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3757-3763.
- Savijoki, K., Ingmer, H., and Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71:394-406.
- Sentandreu, M. A., and Toldrá, F. (2006). A fluorescence-based protocol for quantifying angiotensin-converting enzyme activity. *Nat. Protoc.* 1:2423-2427.
- Smit, G., Smit, B. A., and Engels, W. J. M. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavor profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:591-610.
- Tuler, T. R., Callanan, M. J., and Klaenhammer, T. R. (2002). Overexpression of peptidases in *Lactococcus* and evaluation of their release from leaky cells. *J. Dairy Sci.* 85:2438-2450.

CAPÍTULO CHAPTER

5

Evidencia genética y bioquímica de que cepas recombinantes de *Enterococcus* spp. que expresan la gelatinasa (GelE), producida por *Enterococcus faecalis* DBH18, producen hidrolizados lácteos derivados de la leche desnatada de vaca con actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) y péptidos antihipertensivos

Genetic and biochemical evidence that recombinant *Enterococcus* spp. strains, expressing the gelatinase (GelE), produced by *Enterococcus faecalis* DBH18, produce bovine skim milk-derived hydrolysates with angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitory activity and antihypertensive peptides

ABSTRACT

Genes encoding gelatinase (*gelE*) and serine proteinase (*sprE*), two extracellular proteases produced by *Enterococcus faecalis* DBH18, were cloned in the protein expression vector pMG36c, containing the constitutive P₃₂ promoter, generating the recombinant plasmids pCG, pCSP and pCGSP encoding *gelE*, *sprE* and *gelE-sprE*, respectively. Transformation of non-caseinolytic *E. faecalis* P36, *E. faecalis* JH2-2, *E. faecium* AR24, and *E. hirae* AR14 strains with these plasmids, as well as with pMG36c resulted in detection of caseinolytic activity only in the strains transformed with pCG or pCGSP. Complementation of a deletion (knockout) mutant of *E. faecalis* V583 Δ *gelE* for production of gelatinase (GelE) with plasmid pCG further supports that *gelE* is responsible of the caseinolytic activity of the transformed *E. faecalis* V583 Δ *gelE* (pCG) grown in bovine skim milk (BSM). BSM-derived hydrolysates with high angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitory activity (ACE-IA) were only obtained from the recombinant *Enterococcus* spp. strains transformed with pCG or pCGSP. RP-HPLC-MS/MS analysis of these hydrolysates allowed the identification of 38 major peptide fragments, including peptides with previously reported ACE-IA, antihypertensive, and antioxidant activity.

Keywords: Lactic acid bacteria (LAB), *Enterococcus faecalis*, gelatinase (GelE), serine protease (SprE), ACE-inhibitory activity, ACE-inhibitory peptides.

5.1. INTRODUCTION

Many dietary proteins contain, encrypted within their primary amino acid sequence bioactive peptides with beneficial effects against cardiovascular diseases, inflammation, and cancer (Hernández-Ledesma et al., 2011; Mills et al., 2011). From the bioactive peptides those with angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitory activity (ACE-IA) and blood pressure-lowering effects have been extensively studied due to the high prevalence of hypertension in the Western population (Martínez-Maqueda et al., 2012). Furthermore, peptides with ACE-IA, known as ACE-inhibitory peptides (ACE-IP), are of interest due to their potential use in the treatment of elevated blood pressure and associated cardiovascular events (Wijesekara and Kim, 2010; Phelan and Kerins, 2011). Milk proteins are the main source of bioactive peptides although other animal and plant proteins may also contain these peptides (Contreras et al., 2009; Agyei and Danquah, 2010; Ryan et al., 2011). The release of ACE-IP from food proteins may be achieved by digestive enzymes, hydrolysis with specific proteolytic enzymes or fermentation and ripening during food processing. Fermentation conditions and the proteolytic activity of specific lactic acid bacteria (LAB) seem to modulate the production of ACE-IP during their growth in milk (Nielsen et al., 2009; Otte et al., 2011).

The enterococci are LAB which play a beneficial role in the development of the sensory characteristics of fermented foods being employed as starters in the food industry (Aarestrup et al., 2002), and as probiotics for man and animals (Franz et al., 2011). However, they are also gastrointestinal tract colonizers with lifestyles ranging from intestinal symbionts to multidrug-resistant pathogens responsible of nosocomial and, to a lesser extent, community-acquired infections (Willems et al., 2011). Previous studies have shown that *E. faecalis* strains from food origin produce milk-derived hydrolysates with ACE-IA (Muguerza et al., 2006; Chaves-López et al., 2010; Regazzo et al., 2010) and that most, but not all, *E. faecalis* strains from food, environmental and clinical origin also produce milk-derived hydrolysates with high ACE-IA (Gútiérrez et al., under review). Accordingly, it would be of high scientific and applied interest to identify those *E. faecalis* activities responsible for the production of milk-derived hydrolysates with high ACE-IA.

The zinc metalloprotease gelatinase (GelE) and the serine protease (SprE) are two secreted proteases produced by *E. faecalis* (Mäkinen et al., 1989; Qin et al., 2000) that contributes to biofilm formation, stress response inside the host, host immune system evasion and virulence (Hancock and Perego, 2004; Thomas et al., 2009; Teixeira et al., 2012). On the other hand, the *fsr* (*E. faecalis* regulator) is a two component quorum sensing-dependent regulatory system whose operon encodes the *fsrABCD* genes. The last gene encodes an autoinducing cyclic peptide, named gelatinase biosynthesis activating pheromone (GBAP) that is processed and exported out of the cells by the FsrB protein. Accumulation of GBAP outside the cells is sensed by the FsrC histidine kinase, leading to the activation of the response regulator FsrA. Activated FsrA induces expression of the *fsrBCD* genes. These *fsr* genes are involved in an autoregulatory circuit that results in a boost of GBAP signalling and the induction of the Fsr regulon, among which the *gelE-sprE* operon is the most induced (Bourgogne et al., 2006; Nakayama et al., 2006; Teixeira et al., 2012). In the *gelE-sprE* operon, the gene encoding GelE is located immediately

adjacent to the 3' end of *fsrC* and is cotranscribed with *sprE*. However, despite of their significance for *E. faecalis* virulence both the *fsr* and the *gelE-sprE* loci are present in enterococcal isolates from different ecological environments, suggesting that both the Fsr system and the GelE and SprE proteins may play an additional role, not exclusively associated to virulence, in the biology of *E. faecalis* (Thomas et al., 2009).

E. faecalis DBH18, a bacteriocinogenic strain (Sánchez et al., 2007) producer of bovine skim milk (BSM)-derived hydrolysates with high ACE-IA (Gútiérrez et al., under revision) may synthesize the GelE encoded by its *gelE-sprE* operon (GenBank nº JQ815406) as a 509 amino acid preproenzyme with a predicted N-terminal signal peptide of 29 amino acids, a putative prosequence of 162 amino acids and the mature GelE (Su et al., 1991), which is further subjected to C-terminal processing for full activation of protease activity resulting in a molecular mass of 30 kDa (Del Papa et al., 2007). Similarly, SprE may be synthesized as a 284 amino acid preproenzyme with a predicted N-terminal signal peptide of 32 amino acids, a prosequence of 15 amino acids and the mature serine-type glutamyl endopeptidase (SprE) of a molecular mass of 25 kDa (Kawalec et al., 2005). In this work, we report the cloning of the extracellular proteases GelE and SprE, produced by *E. faecalis* DBH18, in the protein expression vector pMG36c and the genetic and biochemical evidence that recombinant *Enterococcus* spp. expressing GelE produce BSM-derived hydrolysates with ACE-IA due to the production of ACE-IP.

5.2. MATERIALS AND METHODS

5.2.1. . Bacterial strains, plasmids and culture conditions. The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in **Table 5.1**. *E. faecalis* DBH18 (Sánchez et al., 2007) was used as the source of *gelE* and *sprE* (GenBank nº JQ815406). The nucleotide sequence of *gelE* from *E. faecalis* DBH18 shows a 99% and 98% homology with that of *E. faecalis* OG1RF (GenBank nº CP002621) and *E. faecalis* V583 (GenBank nº AE016830), respectively, whereas the nucleotide sequence of *sprE* shows a 98% homology with that of *E. faecalis* OG1RF and *E. faecalis* V583. The enterococcal strains were propagated at 37°C in MRS broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK). When needed, chloramphenicol (Cm) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was added to the recombinant cultures at 10 µg/ml. Reconstituted 10% (w/v) bovine skim milk-powder (BSM) (Oxoid), heated at 121°C for 5 min, was seeded with a loop of the frozen stock of the recombinant cultures and grown at 37°C for 24 h. A 3% (v/v) of the grown cultures was then added to freshly made reconstituted 10% (w/v) BSM and the cultures were further grown at 37°C for 24, 48, and 96 h. After heating at 75°C for 1 min, the cultures were vigorously stirred and centrifuged at 8,000 x g for 10 min. The resulting supernatants were filtered through 0.20 µm pore-size filters (Whatman Int. Ltd., Maidstone, UK) and stored at -20°C before use.

Table 5.1. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Description ^a	Source and/or reference ^b
Strains		
<i>Enterococcus faecalis</i> DBH18	gelE ⁺ , sprE ⁺ , GelE ⁺ , used as the source of gelE and sprE	DNBTA, Sánchez et al. (2007)
<i>Enterococcus faecalis</i> QA53	GelE ⁺	DNBTA, Citti (2005)
<i>Enterococcus faecalis</i> JH2-2	gelE ⁺ , sprE ⁺ , fsrABC ⁻ , GelE ⁻	HRC, Jacob and Hobbs (1974)
<i>Enterococcus faecalis</i> V583	gelE ⁺ , sprE ⁺ , fsrABCD ⁺ , GelE ⁺	LMG, Sahm et al. (1989)
<i>Enterococcus faecalis</i> P4	gelE ⁺ , sprE ⁺ , GelE ⁺	IFR, Eaton and Gasson (2001)
<i>Enterococcus faecalis</i> P36	gelE ⁺ , sprE ⁺ , GelE ⁻	IFR, Eaton and Gasson (2001)
<i>Enterococcus faecalis</i> H10	GelE ⁺	HRC
<i>Enterococcus faecalis</i> 3Er1	GelE ⁺	HRC
<i>Enterococcus faecium</i> AR24	GelE ⁻	DAAUR
<i>Enterococcus hirae</i> AR14	GelE ⁻	DAAUR
Plasmids		
pMG36c	Cm ^r , pMG36e derivative	RUG-MG, van de Guchte et al. (1989)
pCG	Cm ^r , pMG36c derivative carrying the PCR product GEL ^c	This work
pCGSP	Cm ^r , pMG36c derivative carrying the PCR product GEL/SPR ^c	This work
pCSP	Cm ^r , pMG36c derivative carrying the PCR product SPR ^c	This work
pAS222	Integrative vector, Amp ^r	LMG, Jönsson et al. (2009)
pAS222-KO-GelE	Amp ^r , pAS222 derivative	This work

^a Cm^r, chloramphenicol resistant; Amp^r, ampicillin resistant.

^b DAAUR, Departamento de Agricultura y Alimentación, Universidad de la Rioja (Logroño, Spain); DNBTA, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid (Madrid, España); HRC, Departamento de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid, Spain); IFR, Institute of Food Research (Norwich, UK); LMG, Laboratory of Microbial Gene Technology, Department of Chemistry, Biotechnology and Food Science, Norwegian University of Life Sciences (Ås, Norway); NIZO, Department of Biophysical Chemistry, NIZO Food Research (Ede, The Netherlands); RUG-MG, Department of Molecular Genetics, University of Groningen (Haren, Holanda);

^c See Table 2

5.2.2. Determination of gelatin and bovine caseins hydrolysis by different *E. faecalis* strains. Well characterized *E. faecalis* strains from food, environmental, and clinical origin including *E. faecalis* DBH18 (Sánchez et al., 2007) and *E. faecalis* QA53 (Citti, 2005) isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) and aged buffalo cheese, respectively, as well as *E. faecalis* P4 and *E. faecalis* P36 two clinical strains (Eaton and Gasson, 2001), and *E. faecalis* H10 and *E. faecalis* 3Er1 two more clinical strains of the clonal complex 2 (CC2) and CC9, respectively (Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain), were evaluated for their ability to hydrolyze gelatin and bovine milk caseins. For detection of gelatinase activity 5 µl of overnight cultures of the *E. faecalis* strains grown in MRS broth at 37°C were placed into Todd-Hewitt agar (Oxoid) containing 30 g of gelatin (Oxoid) per liter (TH-GEL), grown overnight at 37°C, and placed at 4°C for 5 h before examination of zones of turbidity around the cultures. The caseinolytic activity of the *E. faecalis* strains was also evaluated by placing 5 µl of these cultures into Todd-Hewitt plates containing 1.5% (w/v) of BSM (TH-BSM) which were grown overnight at 37°C. A clear zone of hydrolysis within 24 h of growth was considered positive.

5.2.3. Basic genetic techniques and enzymes. Total genomic DNA from *E. faecalis* DBH18 was isolated using the Wizard® DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). Plasmid DNA isolation was carried out using the High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Diagnostics, East Sussex, UK), as suggested by the manufacturer but with the cells suspended with lysozyme (40 mg/ml) and mutanolysin (500 U/ml) and incubated at 37°C for 10 min before following the kit instructions. All DNA restriction enzymes were supplied by New England BioLabs (Beverly, MA, USA). Ligations were performed with the T4 DNA ligase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). Electrocompetent *Enterococcus* spp. cells were obtained as previously described (Holo and Nes, 1989) and transformed with a Gene Pulser™ and Pulse Controller apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

5.2.4. PCR amplification and nucleotide sequencing. Oligonucleotide primers were obtained from Sigma-Genosys Ltd. (Cambridge, UK). PCR-amplifications were performed in 50 µl reaction mixtures containing 1 µl of purified DNA, 70 pmol of each primer, and 1 U of Platinum® Pfx DNA Polymerase (Invitrogen S.A., Barcelona, Spain). Samples were subjected to an initial cycle of denaturation (97°C for 2 min), followed by 35 cycles of denaturation (94°C for 45 s), annealing (55-58°C for 30 s), and elongation (68°C for 40 s), ending with a final extension step at 68°C for 7 min in a DNA thermal cycler Techgene (Techne, Cambridge, UK). The PCR-generated fragments were purified by a NucleoSpin® Extract II Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany) before cloning into the vector and for nucleotide sequencing. Nucleotide sequencing of purified PCR products was done using the ABI PRISM® BigDye™ Terminator cycle sequence reaction kit and the automatic DNA sequencer ABI PRISM, model 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) at the DNA Sequencing Service (Sistemas Genómicos, Valencia, Spain).

5.2.5. Recombinant plasmids derived from pMG36c. The primers and inserts used for construction of the recombinant plasmids are listed in **Table 5.2**. Total genomic DNA of *E. faecalis* DBH18 was used as template for amplification with the GERL-F/GERL-R, SPL-F/SPL-R, and GERL-F/SPL-R primer pairs of a 1,530-bp *SacI/HindIII*-fragment (GEL) containing *gelE*, a

903-bp *SacI/HindIII*-fragment (SPR) containing *sprE*, and a 2,400-bp *SacI/HindIII* fragment (GEL/SPR) containing *gelE* and *sprE*, respectively. Fragments GEL, SPR and GEL/SPR were digested with the indicated restriction enzymes and inserted into plasmid pMG36c digested with the same enzymes. The ligation mixtures were used to transform *E. faecalis* P36 and the recombinant derivatives checked by their gelatinase and caseinolytic activity. The recombinant plasmids pCG, pCSP and pCGSP were purified from *E. faecalis* P36 and analysed by PCR and sequencing of the inserts. Subsequently, these recombinant plasmids were used to transform *E. faecalis* DBH18, *E. faecalis* JH2-2, *E. faecium* AR24 and *E. hirae* AR14. The caseinolytic activity of the recombinant enterococcal strains was determined by a stab-on-agar test (SOAT) during growth of the selected colonies in TH-BSM plates at 37°C for 24 h and visualization of clear zones of hydrolysis.

Table 5.2. Primers and PCR products used in this study.

Primer or PCR product	Nucleotide sequence (5'-3') or description	PCR product amplified
<u>Primers</u>		
GERL-F	CATAGAGCTCTGTAAG GGAGG ATTTTAGAAATGAAGGG AAATAAAATTTTATACAT	GEL, GEL/SPR
GERL-R	ATAAGTTAAGCTTGTATCATTGACCAGAACAGAT TCACTTG	GEL
SPL-F	CATAGAGCTCTGTAAG GGAGG ATTTTAGAAATGAAAAAG TTCTCCATACGAAAAAT	SPR
SPL-R	ATAAGTTAAGCTTGTATTACGCTGCTGGCACAGCGGAT AAAC	GEL/SPR, SPR
Pr1	TACTCGAGATTTCCCGTGATTCT	R1
Pr2	CTCTGCTGGAATCGGAGCT	R1
Pr3	AGCTCCGATTCCAGCAGAGGGTCACCAGTTGGCGAAG AAGT	R2a
Pr4	GGAAGGAGTTAATTGTTTCTAGAAGGGAAATAAAATTT TATAC	R2a
Pr5	GTATAAAATTTTATTTCCCTTCTAGAAACAATTAAGTCC TTCC	R2b
Pr6	GCTATGGTATTGAGTTATGAGGGGC	R2b
<u>PCR product</u>		
GEL	1,530-pb <i>SacI/HindIII</i> fragment containing the P ₃₂ ribosome binding site and complete <i>gelE</i>	
SPR	903-pb <i>SacI/HindIII</i> fragment containing the P ₃₂ ribosome binding site and complete <i>sprE</i>	
GEL/SPR	2,400-pb <i>SacI/HindIII</i> fragment containing the P ₃₂ ribosome binding site and complete <i>gelE-sprE</i>	

^a Cleavage site for restriction enzymes is italicized; P₃₂ ribosome binding site is shown in bold

5.2.6. Construction and characterization of a gelatinase (*gelE*) deletion (knockout) mutant of *E. faecalis* V583. The deletion of *gelE* in *E. faecalis* V583 was achieved by double-crossover homologous recombination using pAS222 as the cloning vector (Maguin et al., 1996; Jönson et

al., 2009). The gene *sprE* located downstream of *gelE* and the initial sequence of *gelE* were the homologous sequences used in homologous recombination to remove *gelE*. The insert to be cloned into pAS222 was constructed by a three-step PCR. First, the entire *sprE* was amplified with primers Pr1-Pr2 to obtain fragment R1. The fragment R2, with the initial sequence of *gelE* was subjected to a two-step PCR to remove an internal Met (M) codon that could cause residual expression of a truncated gene and further amplified using primer pairs Pr3-Pr4 and Pr5-Pr6 (Table 5.2). Fragments R1 and R2 were then fused using the primer pairs Pr1 and pR6, and the construct was cloned into pAS222 resulting in plasmid pAS222-KO-GelE. To replace the genes on the chromosome with those in the construct the latter plasmid was transformed into electrocompetent *E. faecalis* V583 cells (Holo and Nes, 1989) and the selection for double-crossover events was performed as described by Biswas et al., (1993). The replacement of *gelE* and the integrity of the flanking genes in *E. faecalis* V583 Δ *gelE* was confirmed by DNA sequencing.

5.2.7. Determination of the ACE-inhibitory activity (ACE-IA). The ACE-IA of the supernatants of the recombinant *Enterococcus* spp. grown in BSM was determined by a fluorometric assay (Sentandreu and Toldrá, 2006), with modifications (Quirós et al., 2009). The angiotensin converting enzyme (ACE, peptidyl-dipeptidase A, EC 3.4.15.1) was obtained from Sigma Chemical Co., and the ACE working solution was added to blank (B), control (C) or samples (S). The reaction was started by adding the fluorogenic substrate o-aminobenzoylglycyl-p-nitro-L-phenylalanyl-L-proline (Abz-Gly-p-Phe(NO₂)-Pro-OH) (0.45 mM, Bachem Feinchemikalien, Bubendorf, Switzerland), and the reaction mixture was incubated at 37 °C. The fluorescence of the samples was measured in a Multiscan Microplate Fluorimeter (FLUOstar optima, BMG Labtech, Offenburg, Germany) with the FLUOstar (version 1.32 R2, BMG Labtech) control system for processing of the data. The ACE-IA was expressed as the protein concentration required to inhibit 50% of the ACE activity (IC₅₀). The percentage of ACE-inhibitory activity was calculated as: $100 \times (C-S)/(C-B)$. This parameter was plotted *versus* protein concentration and non-linear adjustment was performed to estimate the IC₅₀ as previously described (Quirós et al., 2007). The protein concentration of the water-soluble extracts was determined by the BCA protein assay (Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, IL USA).

5.2.8. Analysis of the BSM-derived hydrolysates by reversed-phase high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (RP-HPLC-MS/MS). The RP-HPLC-MS/MS analysis of the supernatants obtained after growth of the recombinant *Enterococcus* spp. in BSM was performed on an Agilent 1100 HPLC System (Agilent Technologies, Waldbron, Germany) with column HiPore® (RP318 C₁₈ column 250 x 4.6 mm, 5 µm of particle size; Bio-Rad, Richmond, CA, USA). The HPLC system was connected on-line to an Esquire 3000 quadrupole ion trap (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) equipped with an electrospray ionization source, as previously described (Hernández-Ledesma et al., 2004). The HPLC system was equipped with an electrospray ionization source, as previously described (Hernández-Ledesma et al., 2004). Solvent A was a mixture of water-trifluoroacetic acid (1000:0.37, v/v) and solvent B contained acetonitrile-trifluoroacetic acid (1000:0.27, v/v). Peptides were eluted with a linear gradient of solvent B in A from 0% to 45% in 60 min at a flow rate of 0.8 ml/min. Different spectra were recorded over the mass/charge (m/z) range 100-1500. About 5 spectra were averaged in

the MS and in the MS(n) analyses. The signal threshold to perform auto MS(n) analyses was 10,000 (*i.e.*, 5% of the total signal) and the precursor ions were isolated within a range of 4.0 *m/z* and fragmented with a voltage ramp from 0.35 to 1.4 V. The *m/z* spectral data was transformed to mass values by using the Data Analysis™ (version 3.0; Bruker Daltonik) control program. The BioTools (version 2.1; Bruker Daltonik) was used to process the MS(n) spectra for peptide identification and sequencing.

5.3. RESULTS

5.3.1. Hydrolysis of gelatin and bovine milk caseins by *E. faecalis* strains from different origins. Well characterized *E. faecalis* strains from food, environmental and clinical origin were evaluated for production of gelatinase and their caseinolytic activity. With the exception of *E. faecalis* P36, previously recorded as *gelE*⁺ and *sprE*⁺ but *GelE*⁻ (Eaton and Gasson, 2001), all the strains produced a clear zone of turbidity or hydrolysis after growth on TH-GEL and TH-BSM plates (**Fig. 5.1**). These results suggest that production of *GelE* and *SprE* and/or mutations in the regulatory *fsr* genes for induction of the production of both proteases could play a role in the hydrolysis of gelatin and bovine milk caseins.

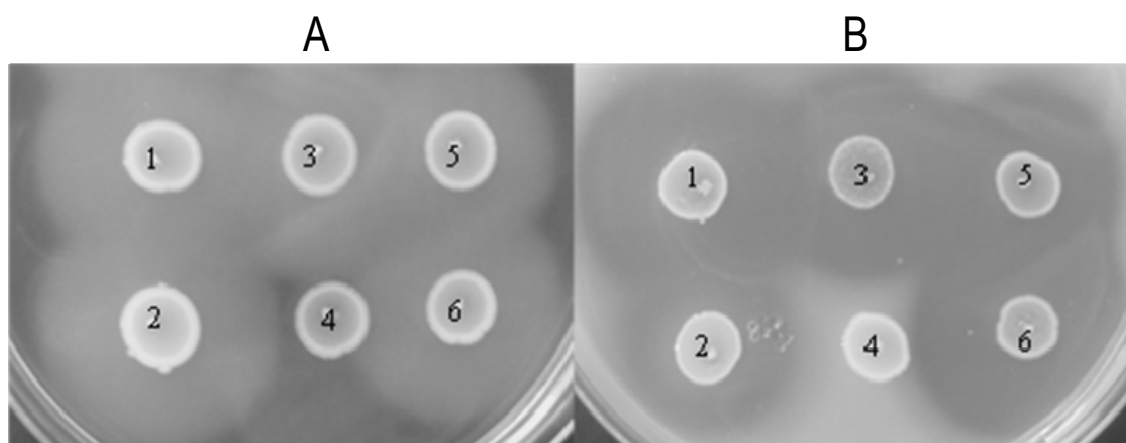


Fig. 5.1. Gelatin (A) and bovine casein hydrolysis (B) by *E. faecalis* strains of food, environmental and clinical origin grown in Todd Hewitt-gelatin (TH-GEL) and Todd Hewitt-bovine skim milk (TH-BSM) plates, respectively. (1) *E. faecalis* DBH18, (2) *E. faecalis* QA53, (3) *E. faecalis* P4, (4) *E. faecalis* P36, (5) *E. faecalis* 3Er1, and (6) *E. faecalis* H10.

5.3.2. Heterologous production and functional expression of *GelE* and *SprE* by recombinant *Enterococcus* spp. strains. To ascertain the role of *GelE* and *SprE* in the caseinolytic activity of the *E. faecalis* strains during their growth in BSM, the genes encoding *GelE* (*gelE*) and *SprE* (*sprE*) in *E. faecalis* DBH18 were cloned in the protein expression vector pMG36c, containing the constitutive P₃₂ promoter, to generate the plasmid-derived vectors pCG, pCSP, and pCGSP encoding the *gelE*, *sprE*, and *gelE-sprE* genes, respectively. Transformation of the non-caseinolytic *E. faecalis* P36, *E. faecalis* JH2-2, *E. faecium* AR24, and *E. hirae* AR14 strains with the above cited plasmids showed that halos of variable size, indicating casein hydrolysis, were produced by the *Enterococcus* spp. strains transformed with pCG or pCGSP but not with pMG36c or pCSP (**Fig. 5.2**). The largest caseinolytic activity was observed in the donor

E. faecalis DBH18 transformed with pCG or pCGSP (Fig. 5.2). A low caseinolytic activity (<2 mm) was observed in *E. faecalis* JH2-2, *E. faecium* AR24 and *E. hirae* AR14 transformed with pMG36c. The caseinolytic activity of *E. faecium* AR24 transformed with pCG and *E. hirae* AR14 transformed with pCG or pCGSP, was lower than that produced by the recombinant *E. faecalis* strains (Fig. 5.2). Despite several attempts, the recombinant *E. faecium* AR24 (pCGSP) derivative was not obtained. On the other hand, no caseinolytic activity was observed in the *Enterococcus* spp. strains transformed with pCSP. To further evaluate the role of *gelE* in the caseinolytic activity of *Enterococcus* spp., *E. faecalis* V583, a Gel⁺ and SprE⁺ strain, was selected to obtain a deletion (knockout) mutant of *gelE* unable to display GelE activity. Accordingly, using plasmid pAS222-KO-GelE an *E. faecalis* V583 Δ *gelE* derivative, lacking caseinolytic activity, was obtained. Further transformation of *E. faecalis* V583 Δ *gelE* with plasmids pCG or pCGSP, but not with pMG36c or pCSP, resulted in a high caseinolytic activity of the recombinant strains after growth in TH-BSM plates (Fig. 5.2).

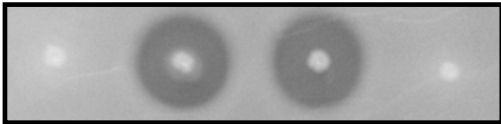
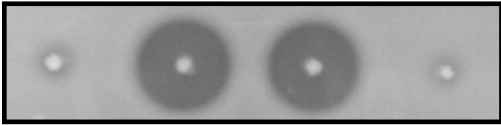
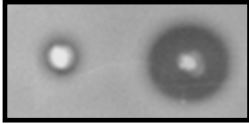
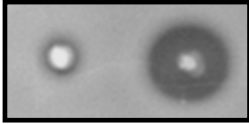
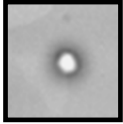
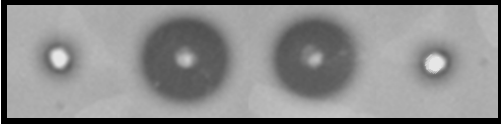
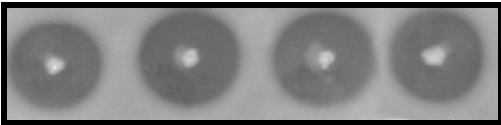
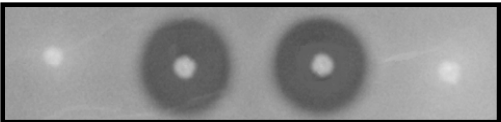
Strain	Plasmid vector			
	pMG36c	pCG	pCGSP	pCSP
<i>E. faecalis</i> P36				
<i>E. faecalis</i> JH2-2				
<i>E. faecium</i> AR24				
<i>E. hirae</i> AR14				
<i>E. faecalis</i> DBH18				
<i>E. faecalis</i> V583 Δ <i>gelE</i>				

Fig. 5.2. Caseinolytic activity of recombinant *E. faecalis* P36, *E. faecalis* JH2-2, *E. faecium* AR24, *E. hirae* AR14, *E. faecalis* DBH18 and *E. faecalis* V583 Δ *gelE* strains transformed with plasmids pMG36c, pCG, pCGSP and pCSP.

5.3.3. ACE-inhibitory activity of recombinant *Enterococcus* spp. strains grown in bovine skim milk (BSM). Supernatants of the recombinant *E. faecalis* P36, *E. faecalis* JH2-2, *E. faecium* AR24, *E. hirae* AR14 and *E. faecalis* DBH18 transformed with pMG36c, pCG, pCGSP or pCSP were evaluated for their ACE-IA after growth in BSM (**Table 5.3**). From the recombinant *Enterococcus* spp. only those transformed with pCG or pCGSP produced BSM-derived hydrolysates with high ACE-IA and IC₅₀ values from 16.2 to 37.7 µg protein/ml. The lowest IC₅₀ values correspond to the highest ACE-IA. Furthermore, the IC₅₀ values of the BSM-derived hydrolysates showed that growth of the active recombinant strains at 37°C during 48 to 96 h shows a steady and high ACE-IA (**Table 5.3**). There were no remarkable differences between the IC₅₀ values from the BSM-derived hydrolysates produced by the strains transformed with pCG and those transformed with pCGSP. No ACE-IA activity was detected in the BSM hydrolysates of the enterococcal strains transformed with pMG36c or pCSP (**Table 5.3**).

Table 5.3. ACE-inhibitory activity (ACE-IA)^a of supernatants of recombinant *Enterococcus* spp. strains grown in bovine skim milk (BSM).

Strain	IC ₅₀ (µg protein/ml)			
	0 h	24 h	48 h	96 h
<i>E. faecalis</i> P36 (pMG36c)	NA	NA	NA	NA
<i>E. faecalis</i> P36 (pCG)	NA	37.7 ± 4.6	24.1 ± 4.5	17.6 ± 1.6
<i>E. faecalis</i> P36 (pCGSP)	NA	33.5 ± 6.3	26.8 ± 5.0	20.0 ± 7.6
<i>E. faecalis</i> P36 (pCSP)	NA	NA	NA	NA
<i>E. faecalis</i> JH2-2 (pMG36c)	NA	NA	NA	NA
<i>E. faecalis</i> JH2-2 (pCG)	NA	23.3 ± 0.5	16.2 ± 5.4	21.5 ± 3.6
<i>E. faecalis</i> JH2-2 (pCGSP)	NA	25.0 ± 3.1	20.5 ± 3.7	19.7 ± 0.4
<i>E. faecalis</i> JH2-2 (pCSP)	NA	NA	NA	NA
<i>E. faecium</i> AR24 (pMG36c)	NA	NA	NA	NA
<i>E. faecium</i> AR24 (pCG)	NA	32.3 ± 1.2	31.0 ± 2.2	33.7 ± 2.6
<i>E. faecium</i> AR24 (pCSP)	NA	NA	NA	NA
<i>E. hirae</i> AR14 (pMG36c)	NA	NA	NA	NA
<i>E. hirae</i> AR14 (pCG)	NA	28.9 ± 3.3	26.8 ± 3.0	23.6 ± 2.5
<i>E. hirae</i> AR14 (pCGSP)	NA	26.4 ± 4.0	21.1 ± 7.9	23.7 ± 4.0
<i>E. hirae</i> AR14 (pCSP)	NA	NA	NA	NA
<i>E. faecalis</i> DBH18 (pMG36c)	NA	9.6 ± 0.7	14.0 ± 3.9	18.2 ± 0.6
<i>E. faecalis</i> DBH18 (pCG)	NA	27.0 ± 3.4	22.2 ± 5.6	19.9 ± 1.1
<i>E. faecalis</i> DBH18 (pCGSP)	NA	24.8 ± 5.1	17.8 ± 0.5	20.2 ± 1.6
<i>E. faecalis</i> DBH18 (pCSP)	NA	12.3 ± 2.1	16.5 ± 2.2	19.2 ± 1.8

^a ACE-inhibitory activity (ACE-IA) expressed as IC₅₀ (µg protein/ml). Data are mean from three independent determinations in triplicate.

NA: No ACE-IA detected.

5.3.4. Major peptide fragments and identification of ACE-inhibitory peptides (ACE-IP) in supernatants of the recombinant *Enterococcus* spp. strains grown in bovine skim milk (BSM). BSM-derived hydrolysates of the recombinant *Enterococcus* spp. with high ACE-IA were subjected to RP-HPLC-MS/MS analysis. The peptide profiles by RP-HPLC of the supernatants of all recombinant strains were obtained after growth in BSM for 0, 24, 48 and 96 h, and those corresponding to *E. faecalis* P36 (pCG) and *E. faecalis* P36 (pCGSP) are shown in Fig. 5.3.

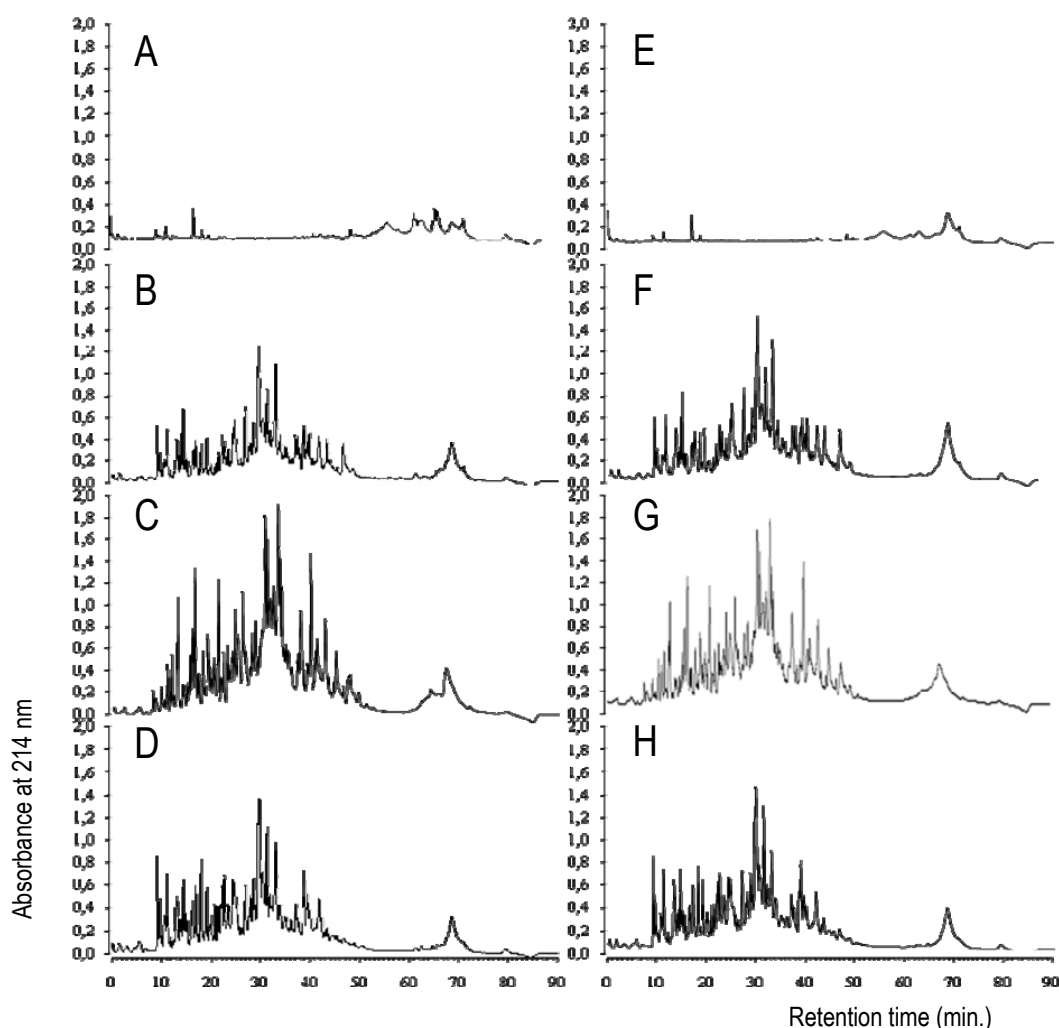


Fig. 5.3. Peptide profiles by RP-HPLC of supernatants of *E. faecalis* P36 (pCG) (A to D) and *E. faecalis* P36 (pCGSP) (E to H) grown in bovine skim milk (BSM) for 0 h (A, E), 24 h (B, F) 48 h (C, G) and 96 h (D, H).

The main peptide profiles of each recombinant *Enterococcus* spp. were further analyzed by tandem MS, and peptide fragments from the total ion chromatogram with a signal >10,000 units were considered as major fragments. Accordingly, the RP-HPLC-MS/MS analysis of the BSM-derived hydrolysates of the recombinant *E. faecalis* P36, *E. faecalis* JH2-2, *E. faecium* AR24, *E. hirae* AR14, and *E. faecalis* DBH18 strains with high ACE-IA allowed the identification of 38 major peptide fragments, 26 of which corresponded to bovine β -casein fragments and 12 to α_{s1} -casein fragments, including peptides with previously reported ACE-IA and antioxidant activity (Table 5.4)..

Table 5.4. Major peptide fragments in supernatants of recombinant *Enterococcus* spp. strains grown in bovine skim milk (BSM).

Observed mass	Calculated mass ^a	Protein fragment	Peptide sequence	Previously described ACE-inhibitory peptides (ACE-IP) ^b	<i>E. faecalis</i> strain
477.2	477.266	β -CN f(187-190)	IQAF	RDMPIQAF	1
558.4	558.309	β -CN f(77-81)	LTQTP	-----	14
561.2	561.320	β -CN f(165-169)	LSQSK	-----	4,6
656.5	656.397	β -CN f(82-87)	VVPPF	VVPPF	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15
671.3	671.383	β -CN f(201-206)	VRGPFP	VRGPFP	1,2,3,4,5,6,7,8,10,11,12,13,14,15
674.3	674.331	β -CN f(1-5)	RELEE	-----	9
688.4	688.434	β -CN f(133-138)	LHLPLP	LHLPLP	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15
697.2	697.299	β -CN f(119-124)	FTESQS	-----	2,5,12,13,14,15
740.6	740.393	β -CN f(62-68)	FPGIPN	VYFPFGIPIPN	14
761.3	761.403	β -CN f(191-196)	LLYQEP	-----	7,8,11,12,15
772.4	773.386	β -CN f(88-94)	LQPEVMG	-----	9
779.4	779.498	β -CN f(170-176)	VLPVPQK	-----	1,2,3,4,5,6,7,8,10,11,12,13,14,15
788.6	788.425	β -CN f(148-154)	HQPLPPT	-----	2,3,6,13,14
801.6	801.519	β -CN f(133-139)	LHLPLPL	LHLPLPL	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15
804.5	804.391	β -CN f(155-161)	VMFPPQS	-----	1,2,3,4,5,6,7,8,10,11,12,13,14,15
849.7	849.478	β -CN f(45-51)	LQDKIHP	DKIHP	9
871.4	871.568	β -CN f(23-29)	ITRINKK	-----	9
903.3	903.462	β -CN f(125-132)	LTLTDVEN	-----	1,2,5,9,10,11,12,15
939.5	939.473	β -CN f(127-134)	LTDVENLH	-----	4,7,11
996.5	996.619	β -CN f(201-209)	VRGPFPIV	VRGPFPIV	1,2,4,5,6,7,8,9,10,11,12,15
1,037.4	1,037.609	β -CN f(197-206)	VLGPVRGPFP	VLGPVRGPFP	9,10
1,112.8	1,112.614	β -CN f(192-201)	LYQEPVLGPV	-----	6,13,14

1,172.5	1,172.572	β -CN f(177-186)	AVYPQRDMP	-----	3,4,7,8,13,14,
1,196.4	1,196.688	β -CN f(77-87)	LTQTPVVPPF	VVPPF	1,2,4,5,10,11,12,15
1,281.8	1,281.636	β -CN f(144-154)	HHQPHQLPPT	-----	7,8,12,13,14,15
1,323.0	1,322.799	β -CN f(165-176)	LSQSKVLVPQK	-----	11
596.3	596.314	α _{S1} -CN f(150-153)	FRQF	-----	8,10,11
633.2	633.356	α _{S1} -CN f(104-108)	YKVPQ	-----	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15
633.4	633.378	α _{S1} -CN f(1-5)	RPKHP	-----	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15
639.5	639.341	α _{S1} -CN f(76-80)	VEQKH	-----	7,8,10,11
656.5	656.477	α _{S1} -CN f(99-103)	LRLKK	-----	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15
706.6	706.409	α _{S1} -CN f(31-36)	VFGKEK	-----	2,7,8,9,13,14
825.6	825.431	α _{S1} -CN f(182-189)	IPNPIGSE	-----	2
872.6	872.462	α _{S1} -CN f(149-154)	LFRQFY	-----	2,5,8,10,11
949.4	949.505	α _{S1} -CN f(127-134)	IHAQQKEP	-----	1,2,3,5,7,11,12,13,14,15
1,002.8	1,002.630	α _{S1} -CN f(101-108)	LKKYKVPQ	KKYNVPQ	12
1,141.4	1,141.515	α _{S1} -CN f(158-168)	LDAYPSGAWY	-----	1,3,4,5,7,11,12,13,14,15
1,218.8	1,218.636	α _{S1} -CN f(25-35)	VAPFPEVFGKE	-----	11

^a Monoisotopic mass.

^b Previously described ACE-inhibitory peptides (ACE-IP) with ACE-IA or sharing, at least, three C-terminal residues with those found in this study.

Recombinant strains: 1. *E. faecalis* P36 (pCG), 24 h; 2. *E. faecalis* P36 (pCG), 48 h; 3. *E. faecalis* P36 (pCG), 96 h; 4. *E. faecalis* P36 (pCGSP), 24 h; 5. *E. faecalis* P36 (pCGSP), 48 h; 6. *E. faecalis* P36 (pCGSP), 96 h; 7. *E. faecalis* JH2-2 (pCG), 48 h; 8. *E. faecalis* JH2-2 (pCGSP), 48 h; 9. *E. faecium* AR24 (pCG), 48 h; 10. *E. hirae* AR14 (pCG), 48 h; 11. *E. hirae* AR14 (pCGSP), 48 h; 12. *E. faecalis* DBH18 (pMG36c), 48 h; 13. *E. faecalis* DBH18 (pCG), 48 h; 14. *E. faecalis* DBH18 (pCGSP), 48 h; 15. *E. faecalis* DBH18 (pCSP), 48 h.

5.4. DISCUSSION

Lactic acid bacteria (LAB) produce a broad range of bioactive peptides including those with ACE-IA due to the activity of bacterial extracellular proteases, cell-envelope associated proteinases and intracellular peptidases (Korhonen and Pihlanto, 2006; Hebert et al., 2008; Otte et al., 2011). However, few studies have considered the role of LAB other than *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. and *Streptococcus* spp. in the production of peptides with ACE-IA due to the fermentation of milk and other proteinaceous food substrates (Gobbetti et al., 2010; Otte et al., 2011). In this study, the observation of halos surrounding colonies of the well characterized *E. faecalis* DBH18, *E. faecalis* QA53, *E. faecalis* P4, *E. faecalis* 3Er1 and *E. faecalis* H10 strains from food, environmental and clinical origin in both, gelatin- and BSM-containing plates, was indicative of their gelatinase and caseinolytic activity. However, the absence of these enzymatic activities in *E. faecalis* P36 grown in gelatin- and BSM-containing plates and the recognition that this isolate is a well characterized *gelE*⁺ and *sprE*⁺ but *GelE*⁻ strain (Eaton and Gasson, 2001), suggest that *GelE* and *SprE* may play an important role in the ACE-IA and production of ACE-IP during growth of the *E. faecalis* strains from food, environmental and clinical origin in BSM.

Accordingly, to ascertain the role of *GelE* and *SprE* produced by *E. faecalis* in their hydrolytic activity against bovine caseins the *gelE*, *sprE* and *gelE-sprE* genes from *E. faecalis* DBH18 were cloned into pMG36c to generate the plasmid-derived vectors pCG (*gelE*), pCSP (*sprE*) and pCGSP (*gelE-sprE*). The expression vector pMG36c is a shuttle vector able to replicate in *E. coli*, *B. subtilis* and LAB, that contains the low copy replication origin of pWV01 and the strong P₃₂ promoter to drive the constitutive transcription of inserted genes into the multicloning site (MCS) of pUC18 (van de Guchte et al., 1989). Transformation of the non-caseinolytic *E. faecalis* P36 (Eaton and Gasson, 2001), *E. faecalis* JH2-2 (Mohamed and Murray, 2006), *E. faecium* AR24, and *E. hirae* AR14 with plasmids pCG or pCGSP, but not with pCSP or pMG36c, resulted in caseinolytic activity of the transformed strains in plates with BSM whereas transformants from the caseinolytic *E. faecalis* DBH18 strain with pCG or pCGSP originated larger BSM-derived halos of hydrolysis (**Fig. 5.2**). Thus, recombinant *Enterococcus* spp. encoding *gelE* but not *sprE* were able to hydrolyze bovine milk caseins during growth in BSM. Although previous studies reported that *SprE* is active on a variety of protein substrates (Kawalec et al., 2005) and that *sprE* contributes to virulence and infection in animal models (Qin et al., 2000; Engelbert et al., 2004), the results obtained in this work suggest that *SprE* by itself is not involved in the hydrolysis of bovine caseins. Although the coexpression of *gelE* and *sprE* by *E. faecalis* may provide some advantages, such as the effect of *GelE* on the maturation of *SprE* (Kawalec et al., 2005) and the role of *SprE* as an immunity protein against the killing action of *GelE* in the fratricide mechanism proposed for production of biofilms by *E. faecalis* (Thomas et al., 2009), the role of *SprE* in the hydrolysis of bovine caseins is yet unknown.

On the other hand, the role of *GelE* in the hydrolysis of bovine caseins was also evaluated in a deletion (knockout) mutant of the caseinolytic *E. faecalis* V583 lacking *gelE*. The deletion event was generated using the cloning shuttle vector pAS222, which contains the thermosensitive replicon of pG⁺ host4 (Maguin et al., 1996; Jönson et al., 2009). Double-crossover events with pAS222-KO-GEL transformed into *E. faecalis* V583 permitted selection of Δ *gelE* cells with loss of

their caseinolytic activity. Restoration of the GelE⁺ phenotype was achieved after transformation of *E. faecalis* V583 $\Delta gelE$ with pCG or pCGSP, but not with pMG36c or pCSP (**Fig. 5.2**). The results of these complementation experiences confirm that *gelE* from *E. faecalis* DBH18 confers caseinolytic activity.

Experiences were also performed to determine the ACE-IA of the recombinant *Enterococcus* spp. strains grown in BSM. A high ACE-IA was found in supernatants of *E. faecalis* P36, *E. faecalis* JH2-2, *E. faecium* AR24 and *E. hirae* AR14 transformed with plasmids pCG or pCGSP. However, no ACE-IA was observed in the *Enterococcus* spp. strains transformed with pCSP or pMG36c (**Table 5.3**). Most of the BSM-derived hydrolysates generated by the recombinant *Enterococcus* spp. showed a low IC₅₀ and, consequently, a high ACE-IA. Considering that extended fermentation times involve higher energy and economical expenses and increase the chance of microbial contamination, the growth of the recombinant *Enterococcus* spp. in BSM at 37 °C for 48 h may be considered as satisfactory for production of BSM-derived hydrolysates with high ACE-IA (**Table 5.3**). Since GelE is mainly produced by *E. faecalis* strains carrying antibiotic-resistance genes and/or genes coding other potential virulence factors, other enterococci, as the recombinant *E. faecium* and/or *E. hirae* strains developed in this work, could be used as safer and alternative bacterial hosts for production and functional expression of the GelE. Moreover, given that the N-terminal signal peptide of GelE (SP_{GelE}) drives the processing and transport of GelE out of the heterologous *Enterococcus* spp. producer cells, chimeras of the SP_{gelE} genetically fused to other enzymes, proteins or biologically active peptides could permit their safer and higher production, processing and functional expression by other enterococci and, possibly, other LAB (Borrero et al., 2011). The ACE-IA of *E. faecalis* DBH18 transformed with pCG or pCGSP originated larger halos of caseinolytic activity but lower ACE-IA than the parent *E. faecalis* DBH18 (pMG36c) (**Table 5.3**). This lower ACE-IA of the transformed *E. faecalis* DBH18 derivatives with a higher production of GelE may be due to degradation of higher molecular mass peptides with synergistic ACE-IA (Gobbetti et al., 2000; Raghavan and Kristinsson, 2009).

Peptide profiles of BSM-derived hydrolysates of *E. faecalis* P36 (pCG) and *E. faecalis* P36 (pCGSP) grown in BSM are shown in **Fig. 5.3**. No hydrolysis of BSM, evidenced by the absence of peptide fragments, was observed after growth of *E. faecalis* P36 (pCSP) and *E. faecalis* P36 (pMG36c) in BSM (results not shown). On the other hand, similar peptide profiles were generated by *E. faecalis* P36 (pCG) and *E. faecalis* P36 (pCGSP), suggesting that the hydrolysis of bovine caseins seems not to be affected by the coexpression of *gelE* and *sprE*. Similarly, few modifications were observed in the BSM-derived major peptide profiles during the fermentation process, suggesting that most of the release of ACE-IP takes place during the first 24 h of growth of the *E. faecalis* P36 strains transformed with pCG or pCGSP.

Furthermore, RP-HPLC-MS/MS analysis of the BSM-derived hydrolysates from the recombinant *Enterococcus* spp. with high ACE-IA allowed the identification of 38 major peptide fragments, including peptides with previously reported ACE-IA and antioxidant activity. Peptides such as LQDKIHP [*f*(47-51)], FPGPIPN [*f*(82-87)], VVPPF [*f*(99-103)], LHLPLP [*f*(133-138)], LHLPLPL [*f*(133-139)], IQAF [*f*(187-190)], VLGPVRGPF [*f*(197-206)], VRGPF [*f*(201-206)], and VRGPFPIIV [*f*(201-209)] were generated from bovine β -casein, while others, such as

LKKYKVPQ [f(101-108)] derived from bovine α_{s1} -casein (**Table 5.4**). These peptide fragments have been reported to be produced by *E. faecalis* strains from food, environmental and clinical origin and show a high ACE-IA or share, at least, three C-terminal residues with those with known ACE-IA (Smacchi and Gobbetti, 2000; Gómez-Ruiz et al., 2002; Robert et al., 2004; Quirós et al., 2005; Contreras et al., 2009; Gútiez et al., under revision). Moreover, the peptide LHLPLP resistant to gastrointestinal proteases is a true competitive inhibitor of ACE and shows a potent antihypertensive activity in spontaneously hypertensive rats (SHR) (Miguel et al., 2006; Quirós et al., 2009). On the other hand, the peptide VLPVPQK [β -casein, f(170-176)] previously reported as antioxidant (Rival et al., 2001) has also been identified among the major peptides present in most of *E. faecalis* hydrolysates (**Table 5.4**). The major peptides identified in the BSM-derived hydrolysates may be subject to variation due to complex interactions between growth of the enterococci and hydrolysis of their substrate. In this context, several β -casein derived peptides such as VVPPF [f(82-87)], LHLPLP [f(133-138)] and LHLPLPL [f(133-139)] or the α_{s1} -casein-derived peptides, such as RPKHP [f(1-5)], LRLKK [f(99-103)] and YKVPQ [f(104-108)] were present in the hydrolysates of all the active *Enterococcus* spp. whereas other BSM-derived peptides were less frequent (**Table 5.4**). Interestingly, all the BSM-derived hydrolysates produced by *E. faecalis* DBH18 and the active recombinant *E. faecalis*, *E. faecium* and *E. hirae* derivatives contained, at least, the ACE-inhibitory peptides LHLPLP, LHLPLPL and VVPPF, and the antioxidant peptide VLPVPQK.

In addition, most of the cleavage sites of the peptide fragments generated from β -casein and α_{s1} -casein implicated the hydrophobic amino acid residues leucine (L), isoleucine (I) or phenylalanine (F) (**Fig. 5.4**), as previously described for the GelE produced by *E. faecalis* OG1-10 (Mäkinen et al., 1989). However, no glutamic acid (E)-Xaa cleavage fragments derived from a putative SprE proteolytic activity were detected (Kawalec et al., 2005).

Consequently, the pattern of β -casein and α_{s1} -casein breakdown and the release of bioactive peptides observed in the BSM-derived hydrolysates produced by the recombinant *E. faecalis* P36, *E. faecalis* JH2-2, *E. faecium* AR24 and *E. hirae* AR14 may correspond to the activity of the strongly hydrophobic metalloendopeptidase GelE from *E. faecalis* DBH18. The observation that GelE produces BSM-derived peptide fragments with ACE-IA and antioxidant activity may raise expectations for its potential use as an enterococcal-derived protease for production of bioactive peptides from the hydrolysis of different food-derived proteinaceous substrates.

It has been reported that GelE is produced by approximately 60% of the clinical *E. faecalis* isolates, that the GelE⁺ phenotype requires the concomitant presence of both the *fsr* and *gelE* genes, and that loss of the GelE⁺ phenotype is usually attributed to a 23.9 kb chromosomal deletion involving *fsrABCD* that likely results from horizontal gene transfer and recombination (Galloway-Peña et al., 2011; Teixeira et al., 2012). However, in *E. faecalis* strains with apparently complete *fsr* and *gelE* loci the Gel⁻ phenotype also correlates with a specific nonsense codon in the FsrC protein which prevents these isolates from sensing GBAP (Teixeira et al., 2012). Nevertheless, in certain *E. faecalis* strains, even in the absence of a functional *fsr* system a basal level of GelE and SprE is produced (Singh et al., 2005). Furthermore, while the presence of a functional Fsr system and/or GelE production increases the severity of disease in animal, plant,

and nematode models of *E. faecalis* infection, none of them are required for the organism to cause disease (Galloway-Peña et al., 2011). Accordingly, it may be considered that *E. faecalis* strains producers of GelE may play an additional role, not associated to virulence, in the production of human bioactive peptides with human health connotations. Moreover, safer recombinant *Enterococcus* spp. and other LAB and microbial hosts heterologous producers of active GelE could be of interest for future pharmaceutical, medical, and veterinary applications.

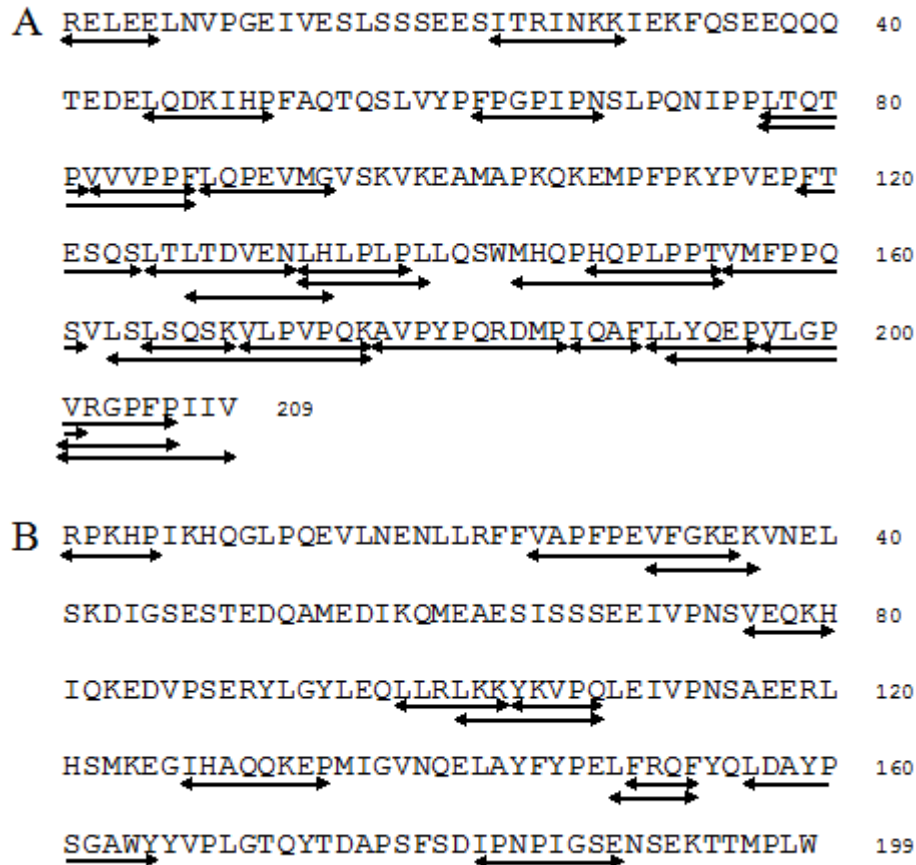


Fig. 5.4. Location of the major peptides (doubled-ended arrows) identified in the primary sequences of β -casein (A) and α_{s1} -casein (B) present in bovine skim milk (BSM)-derived hydrolysates originated by the gelatinase (GelE) produced by recombinant *Enterococcus* spp. encoding *gelE* and *sprE* from *E. faecalis* DBH18.

5.5. ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. T. Eaton, Institute of Food Research, Norwich (UK), Dr. Rosa del Campo, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid (Spain), and Dr. Carmen Torres, Universidad de La Rioja, Logroño (Spain) for providing strains, and to Z. Saleihan, Prof. D.B. Diep and Prof. I. F. Nes for help in design of *E. faecalis* V583 Δ *gelE*. This work was partially supported by project AGL2012-34829 from the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), by projects AGL2009-08348 and AGL2011-24643 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN), by a CENIT project (2006-2009) from the MITC-CDTI, by grant GR35-10A from the BSCH-UCM, and

by grant S2009/AGR-1489 from the Comunidad de Madrid (CAM). L. Gúti ez holds a fellowship (FPU) from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC), J. Borrero held a research contract from the CAM, and J. J. Jiménez was recipient of a fellowship from the MICINN, Spain.

5.6. REFERENCES

- Aarestrup, F. M., Butaye, P., and White, W. (2002). Nonhuman reservoirs of enterococci. In *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance*, pp- 55-59. Edited by M. S. Gilmore. Washington DC: American Society for Microbiology.
- Agyei, D., and Danquah, M. K. (2010). Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnol. Adv.* 29:272-177.
- Biswas, I., Gruss, A., Ehlich, S. D., and Maguin, E. (1993). High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 175:3628-3635.
- Borrero, J., Jiménez, J. J., G  ti ez, L., Herranz, C., Cintas, L. M., and Hernández, P. E. (2011). Protein expression vector and secretion signal peptide optimization to drive the production, secretion, and functional expression of the bacteriocin enterocin A in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 156:76-86.
- Bourgogne, A., Hilsenbeck, S. G., Dunne, G. M., and Murray, B. E. (2006). Comparison of OG1RF and an isogenic *fsrB* deletion mutant by transcriptional analysis: the Fsr system of *Enterococcus faecalis* is more than activator of gelatinase and serine proteinase. *J. Bacteriol.* 188:2875-2884.
- Chaves-López, C., Serio, A., Matrascelli, M., Papparella, A., Osorio-Cadavid, E., and Suzzi, G. (2010). Microbiological characteristics of kumis, a traditional fermented Colombian milk, with particular emphasis on enterococci population. *Food Microbiol.* 28:1041-1047.
- Citti, R. (2005). Aislamiento e identificación de bacterias lácticas bacteriocinogénicas de leches y quesos de búfala de Venezuela: actividad antimicrobiana y caracterización bioquímica y genética de sus bacteriocinas. *Ph.D. Thesis*. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, Spain.
- Contreras, M. M., Carrón, R., Montero, M. J., Ramos, M., and Recio, I. (2009). Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *Int. Dairy J.* 19:566-573.
- Del Papa, M. F., Hancock, L. E., Thomas, V. C., and Perego, M. (2007). Full activation of *Enterococcus faecalis* gelatinase by a C-terminal proteolytic cleavage. *J. Bacteriol.* 189:8835-8843.
- Eaton, T. J., and Gasson, M. J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1628-1635.
- Engelbert, M., Mylonakis, E., Ausubel, F. M., Calderwood, S. B., and Gilmore, M. S. (2004). Contribution of gelatinase, serine protease, and *fsr* to the pathogenesis of *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. *Infect. Immun.* 72:3628-3633.
- Franz, C. M. A. P., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., and Gálvez, A. (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 151:125-140.
- Galloway-Peña, J. R., Bourgogne, A., Qin, X., and Murray, B. E. (2011). Diversity of the *fsr-gelE* region of the *Enterococcus faecalis* genome but conservation in strains with partial deletions of the *fsr* operon. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:442-451.

- Gobbetti, M., Di Cagno, R., and De Angelis, M. (2010). Functional microorganisms for functional food quality. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 50:716-727.
- Gobbetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffredi, F., and Addeo, F. (2000). Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3898-3904.
- Gómez-Ruiz, J. A., Ramos, M., and Recio, I. (2002). Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *Int. Dairy J.* 12:697-706.
- Gútiérrez, L., Gómez-Sala, B., Recio, I., del Campo, R., Cintas, L. M., Herranz, C., and Hernández, P. E. *Enterococcus faecalis* strains from food, environmental, and clinical origin produce ACE-inhibitory peptides and other bioactive peptides during growth in bovine skim milk. *Int. J. Food Microbiol.* (Manuscript under revision).
- Hancock, L. E., and Perego, M. (2004). The *Enterococcus faecalis* fsr two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. *J. Bacteriol.* 186:5629-5639.
- Hebert, E. M., Mamone, G., Picariello, G., Raya, R. R., Savoy, G., Ferranti, P., and Addeo, F. (2008). Characterization of the pattern of α_{S1} - and β -casein breakdown and release of a bioactive peptide by a cell envelope proteinase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:3682-3689.
- Hernández-Ledesma, B., Contreras, M. M., and Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods. *Adv. Colloid Interface Sci.* 165:23-35.
- Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M., and Recio, I. (2004). Application of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the identification of biologically active peptides produced by milk fermentation and simulated gastrointestinal digestion. *J. Chromatogr.* 17:107-114.
- Holo, H., and Nes, I. F. (1989). High frequency transformation by electroporation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:3119-3123.
- Jacob, A., and Hobbs, S. J. (1974). Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*. *J. Bacteriol.* 117:360-372.
- Jönsson, M., Saleihan, Z., Nes, I. F., and Holo, H. (2009). Construction and characterization of three lactate dehydrogenase-negative *Enterococcus faecalis* V583 mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:4901-4903.
- Kawalec, M., Potempa, J., Moon, J. L., Travis, J. and Murray, B. E. (2005). Molecular diversity of a putative virulence factor: purification and characterization of isoforms of an extracellular serine glutamyl endopeptidase of *Enterococcus faecalis* with different enzymatic activities. *J. Bacteriol.* 187:266-275.
- Korhonen, H., and Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *Int. Dairy J.* 16:945.
- Maguin, E., Prévost, H., Ehrlich, S. D., and Gruss, A. (1996). Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other Gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 178:931-935.
- Mäkinen, P. L., Clewell, D. B., An, F., and Mäkinen, K. K. (1989). Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metalloendopeptidase ("gelatinase") from *Streptococcus faecalis* (OG1-10). *J. Biol. Chem.* 264:3325-3334.

- Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., Recio, I., and Hernández-Ledesma, B. (2012). Antihypertensive peptides from proteins: a review. *Food Funct.* 3:350-361.
- Miguel, M., Recio, I., Ramos, M., Delgado, M. A., and Aleixandre, M. A. (2006). Antihypertensive effect of peptides obtained from *Enterococcus faecalis*-fermented milk in rats. *J. Dairy Sci.* 89:3352-3359.
- Mills, S., Ross, R. P., Hill, C., Fitzgerald, G. F., and Stanton, C. (2011). Milk intelligence: mining milk for bioactive substances associated with human health. *Int. Dairy J.* 21:377-401.
- Mohamed, J. A., and Murray, B. E. (2006). Influence of the *fsr* locus on biofilm formation by *Enterococcus faecalis* lacking *gelE*. *J. Med. Microbiol.* 55:1747-1750.
- Muguerza, B., Ramos, M., Sánchez, E., Manso, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A., Delgado, M. A., and Recio, I. (2006). Antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk. *Int. Dairy J.* 16:61-69.
- Nakayama, J., Chen, S., Oyama, N., Nishiguchi, K., Azab, E. A., Tanaka, E., Kariyama, R., and Sonomoto, K. (2006). Revised model for *Enterococcus faecalis* *fsr* quorum-sensing system: the small open reading frame *fsrD* encodes the gelatinase biosynthesis-activating pheromone propeptide corresponding to staphylococcal *agrD*. *J. Bacteriol.* 188:8321-8326.
- Nielsen, M. S., Martinussen, T., Flambard, B., Sørensen, K. I., and Otte, J. (2009). Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: Effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. *Int. Dairy J.* 19:155-165.
- Otte, J., Lenhard, T., Flambard, B., and Sørensen, K. I. (2011). Influence of fermentation temperature and autolysis on ACE-inhibitory activity and peptide profiles of milk fermented by selected strains of *Lactobacillus helveticus* and *Lactococcus lactis*. *Int. Dairy J.* 21:229-238.
- Phelan, M., and Kerins, D. (2011). The potential role of milk-derived peptides in cardiovascular disease. *Food Funct.* 2:153-167.
- Qin, X., Singh, K. V., Weinstock, G. M., and Murray, B. E. (2000). Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infect. Immun.* 68:2579-2586.
- Quirós, A., Contreras, M. M., Ramos, M., Amigo, L., and Recio, I. (2009). Stability to gastrointestinal enzymes and structure-activity relationship of β -casein-peptides with antihypertensive properties. *Peptides* 30:1848-1853.
- Quirós, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A., and Recio, I. (2007). Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *Int. Dairy J.* 17:33-41.
- Quirós, A., Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Amigo, L., and Recio, I. (2005). Angiotensin converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir. *J. Dairy Sci.* 88:3480-3487.
- Raghavan, S., and Kristinsson, H. (2009). ACE-activity of tilapia protein hydrolysates. *Food Chem.* 117:582-588.
- Regazzo, D., Da Dalt, L., Lombardi, A., Andrighetto, A., Negro, A., and Gabai, G. (2010). Fermented milks from *Enterococcus faecalis* TH563 and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LA2 manifest different degrees of ACE-inhibitory and immunomodulatory activities. *Dairy Sci. Technol.* 90:469-476.

- Rival, S. G., Boeriu, C. G., and Wichers, H. J. (2001). Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *J. Agric. Food Chem.* 49:295-302.
- Robert, M. C., Razaname, A., Mutter, M., and Juillerat, M. A. (2004). Peptides derived from sodium caseinate hydrolysates produced by *Lactobacillus helveticus* NCC2765. *J. Agric. Food Chem.* 52:6923-6931.
- Ryan, J. T., Ross, R. P., Bolton, D., Fitzgerald, G. F., and Stanton, C. (2011). Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. *Nutrients* 3:765-791.
- Sahm, D. F., Kissinger, J., Gilmore, M. S., Murray, P. R., Mulder, R., Solliday, J., and Clarke, B. (1989). *In vitro* susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 133:1588-1591.
- Sánchez, J., Basanta, A., Gómez-Sala, B., Herranz, C., Cintas, L. M., and Hernández, P. E. (2007). Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Int. J. Food Microbiol.* 117:295-305.
- Sentandreu, M. A., and Toldrá, F. (2006). A fluorescence-based protocol for quantifying angiotensin-converting enzyme activity. *Nat. Protoc.* 1:2423-2427.
- Singh, K. V., Nallapareddy, S. R., Nannini, E. C., and Murray, B. E. (2005). Fsr-independent production of protease(s) may explain the lack of attenuation of an *Enterococcus faecalis* *fsr* mutant versus a *gelE-sprE* mutant in induction of endocarditis. *Infect. Immun.* 73:4888-4894.
- Smacchi, E., and Gobetti, M. (2000). Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiol.* 17:129-141.
- Su, Y. A., Sulavik, M. C., He, P., Makinen, K. K., Makinen, P. L., Fielder, S., Wirth, R., and Clewell, D. B. (1991). Nucleotide sequence of the gelatinase gene (*gelE*) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. *Infect. Immun.* 59:415-420.
- Teixeira, N., Santos, S., Marujo, P., Yokohata, R., Iyer, V. S., Nakayama, J., Hancock, L. E., Serror, P., and Silva Lopes, M. F. (2012). The incongruent gelatinase genotype and phenotype in *Enterococcus faecalis* are due to shutting off the ability to respond to the gelatinase biosynthesis-activating pheromone (GBAP) quorum-sensing signal. *Microbiology* 158:519-528.
- Thomas, V. C., Hiromasa, Y., Harms, N., Thurlow, L., Tomich, J., and Hancock, L. E. (2009). A fratricidal mechanism is responsible for eDNA release and contributes to biofilm development in *Enterococcus faecalis*. *Mol. Microbiol.* 72:1022-1036.
- van de Guchte, M., van der Vossen, J. M., Kok, J., and Venema, G. (1989). Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:224-228.
- Wijesekara, I., and Kim, S-K. (2010). Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors from marine resources: prospects in the pharmaceutical industry. *Mar. Drugs* 8:1080-1093.
- Willems, R. J. L., Hanage, W. P., Bessen, D. E., and Feil, E. J. (2011). Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 35:872-900.

CAPÍTULO CHAPTER

6

Producción heteróloga de proteasas por bacterias lácticas (BAL) y levaduras: *Lactobacillus casei* CECT475 que expresa la gelatinasa (GelE), producida por *Enterococcus faecalis* DBH18, libera péptidos inhibidores de la ECA durante su desarrollo en leche desnatada de vaca

Heterologous expression of proteases by lactic acid bacteria (LAB) and yeasts: *Lactobacillus casei* CECT475 expressing the gelatinase (GelE), produced by *Enterococcus faecalis* DBH18, releases ACE-inhibitory peptides (ACE-IP) during growth in bovine skim milk

ABSTRACT

Transformation of selected lactic acid bacteria (LAB) from the genera *Lactococcus*, *Lactobacillus* and *Streptococcus* with plasmids pCG (*gelE*), encoding gelatinase (GelE) or pCGSP (*gelE-sprE*) encoding GelE and serine protease (GelE-SprE), two extracellular proteases produced by *Enterococcus faecalis* DBH18, permitted production of caseinolytic activity by recombinant *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403, *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 and *Lactobacillus casei* CECT475 derivatives. The growth of *Lb. casei* CECT475 (pCG) and *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) in bovine skim milk (BSM) produced BSM-derived hydrolysates with high angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitory activity (ACE-IA). RP-HPLC-MS/MS analysis of these hydrolysates revealed the presence of peptide fragments with previously reported ACE-IA, antihypertensive, and antioxidant activities. A competitive indirect ELISA (CI-ELISA) has been also developed for detection and quantification of the antihypertensive peptide LHLPLP in the BSM-derived hydrolysates. Cloning of fragments encoding the *gelE* proenzyme (GE) and mature *gelE* (MGE) from *E. faecalis* DBH18 into the pPICZαA and pKLAC2 protein expression vectors resulted in the recombinant plasmids pPICGE, pPICMGE and pKLGE which were then transformed into *Pichia pastoris* X-33 and *Kluyveromyces lactis* GG799. However, none of the *P. pastoris* X-33GE (GE), *P. pastoris* X-33MGE (MGE) and *K. lactis* GG799GE (GE) recombinants showed extracellular caseinolytic or proteolytic activity.

Keywords: Gelatinase, heterologous production, ACE-inhibitory peptides, lactic acid bacteria (LAB), *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*.

6.1. INTRODUCTION

A wide range of proteins from fish, meat, egg, milk and cereals have been reported to contain, encrypted within their primary amino acid sequence, biologically active peptides with potential beneficial effects on human health due to its antimicrobial, antioxidant, antithrombotic, antiproliferative, immunomodulatory, opioid and antihypertensive activities (De Leo et al., 2009; Mills et al., 2011; Ryan et al., 2011). Among the bioactive peptides derived from milk proteins, those with angiotensin-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity (ACE-IA) are of great interest for their potential use in the treatment of elevated blood pressure and associated cardiovascular events (Phelan and Kerins, 2011). Therefore, ACE-inhibitory peptides (ACE-IP) are of interest in the development of functional foods with ACE-IA (Hernández-Ledesma et al., 2011; Sánchez et al., 2011; Martínez-Maqueda et al., 2012).

Bioactive peptides can be released from precursor proteins by the action of digestive enzymes during their gastrointestinal transit, by fermentation with lactic acid bacteria (LAB) or by hydrolysis with specific proteolytic enzymes and food grade proteolytic preparations sourced from animals, plants, and microbes. Given the proteolytic nature of many LAB, their use or that of their most active proteases has been evaluated for production of milk-derived hydrolysates with ACE-IA (Yamamoto et al., 1994; Minervini et al., 2003; Muguerza et al., 2006; Guo et al., 2009; Otte et al., 2011). Recent reports by our research group also indicate that most, but not all, *E. faecalis* strains from food, environmental and clinical origin produce milk-derived hydrolysates with high ACE-IA. They also provide the genetic and biochemical evidence of the involvement of gelatinase (GelE) in the production of bovine skim milk (BSM)-derived hydrolysates with high ACE-IA, due to the release of ACE-IP (Gútiérrez et al., manuscript a and b, under revision).

The zinc metalloendopeptidase GelE and the serine protease (SprE) are two extracellular proteases produced by *E. faecalis* (Mäkinen et al., 1989; Qin et al., 2000) whose synthesis is regulated by the *fsr* (*E. faecalis* regulator), a two component quorum sensing-dependent regulatory system whose operon encodes the *fsrABCD* genes. The products of these genes induce the Fsr regulon, among which the *gelE-sprE* operon is the most induced (Teixeira et al., 2012). The protease GelE (30 kDa), produced among other enterococci by *E. faecalis* DBH18 (Sánchez et al., 2007; GenBank nº JQ815406), is synthesized as a 509 amino acid preproenzyme consisting on a predicted N-terminal signal peptide of 29 amino acids, a putative prosequence of 162 amino acids and the mature enzyme of a molecular mass of 30 kDa, which is further subjected to C-terminal processing for full activation of its protease activity (Del Papa et al., 2007). Similarly, SprE is synthesized as a 284 amino acid preproenzyme with a predicted N-terminal signal peptide of 32 amino acids, a prosequence of 15 amino acids and the mature serine-type glutamyl endopeptidase (SprE) of a molecular mass of 25 kDa (Kawalec et al., 2005).

The observation that recombinant *Enterococcus* spp. encoding *gelE* and *gelE/sprE* from *E. faecalis* DBH18, but not the *sprE* alone, release bioactive peptides with ACE-IA during their growth in BSM (Gútiérrez et al., manuscript b under revision) prompted us to evaluate the functional expression of *gelE* and *gelE/sprE* by non-enterococcal LAB, as well as the cloning of the *gelE* proenzyme (GE) and mature *gelE* (MGE) for their expression by two different yeast platforms.

The recombinant LAB, heterologously producing these proteases would stand less safety issues than the enterococci for production of bioactive peptides with high ACE-IA during their growth in BSM and other food substrates, whereas the high density fermentation capabilities of recombinant yeasts would facilitate the large-scale industrial production of active GelE.

6.2. MATERIALS AND METHODS

6.2.1. Bacterial strains, culture conditions, plasmids, and general genetic techniques.

Some of the bacterial strains and plasmids used in this study are listed in **Table 6.1**. The lactic acid bacteria (LAB) used were *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 (Chopin et al., 1984) and *L. lactis* subsp. *cremoris* (Kuipers et al., 1998), as well as those of *Lactobacillus casei* CECT475, *Lb. acidophilus* CECT903, *Lb. curvatus* CECT904, *Lb. delbruecki* subsp. *bulgaricus* CECT4005, *Lb. fermentum* CECT4007, *Lb. johnsonii* CECT289 and *Lb. rhamnosus* CECT275, obtained from the Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, Spain). The strains of *Streptococcus thermophilus* LDM-9 and *St. thermophilus* LMG18311 were obtained from the Norwegian University of Life Sciences, Aas (Norway). The lactococcal strains were propagated in M17 broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) supplemented with 0.5% (w/v) glucose (GM17), at 32 °C. All the lactobacilli were grown at 37 °C in MRS broth (Oxoid) and the *St. thermophilus* strains were cultivated at 37 °C in Hogg-Jago glucose broth (HJG) consisting of 3% tryptone, 1% yeast extract, 0.2% beef extract, 0.5% KH₂PO₄, and 0.5% glucose. *Pichia pastoris* X-33 (Invitrogen S.A., Barcelona, Spain) and *Kluyveromyces lactis* GG799 (New England BioLabs, Beverly, MA, USA) were grown in yeast extract-peptone-dextrose (YPD) medium (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) at 30 °C with shaking (250 rpm). *E. coli* JM109 (Promega, Madison, WI, USA) was grown in LB broth (Sigma-Aldrich) at 37 °C with shaking (250 rpm). Agar plates were prepared by adding 1.5% (w/v) agar to the media. When needed, chloramphenicol (Cm) (Sigma), zeocin (Zeo) (Invitrogen) and ampicillin (Amp) (Sigma) were used at 10, 25, and 50 µg/ml, respectively. The recombinant plasmids pCG and pCGSP (**Table 6.1**) were transformed to competent cells by using a previously cited procedure (Holo and Nes, 1989; Aukrust et al., 1995; Blomqvist et al., 2006), and transformed with a Gene Pulser™ and Pulse Controller apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The caseinolytic activity of the recombinant LAB was examined by a stab-on-agar test (SOAT) using Todd Hewitt-bovine skim milk agar plates (TH-BSMA) made by addition of 1.5% (w/v) agar (Oxoid) to TH broth (Oxoid) supplemented with 1.5% (v/v) organic, pasteurized and non-homogenized (0.1% milk fat) bovine skim milk (BSM) (Thise, Roslev, Denmark). The appearance of clear zones of hydrolysis after incubation of the plates at 37 °C during 24 h was indicative of the caseinolytic activity.

Table 6.1. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Description ^a	Source and/or reference ^b
Strains		
<i>E. faecalis</i> DBH18	GelE and SprE producer	DNBTA, Sánchez et al. (2007)
<i>E. faecalis</i> P36	Source of plasmid pCG and pCGSP	Gútiérrez et al., Manuscript b under review
<i>P. pastoris</i> X-33	Yeast strain used as heterologous host	Invitrogen
<i>K. lactis</i> GG799	Yeast strain used as heterologous host	New England Biolabs
<i>E. coli</i> JM109	Selection of recombinant plasmids	Promega
Plasmids		
pMG36c	Cm ^r , pMG36e derivative	RUG-MG, Van de Guchte et al. (1989)
pCG	Cm ^r , pMG36c derivative carrying <i>gelE</i> from <i>E. faecalis</i> DBH18.	Gútiérrez et al., Manuscript b under review
pCGSP	Cm ^r , pMG36c derivative carrying <i>gelE</i> and <i>sprE</i> from <i>E. faecalis</i> DBH18	Gútiérrez et al., Manuscript b under review
pPICZαA	Zeo ^r ; integrative plasmid carrying the secretion signal sequence from the <i>Saccharomyces cerevisiae</i> α factor prepropeptide and functional sites for integration at the 5'AOX1 locus of <i>P. pastoris</i> X-33	Invitrogen Life Technologies
pPICGE	pPICZαA carrying the PCR product GE	This work
pPICMGE	pPICZαA carrying the PCR product MGE	This work
pKLAC2	Amp ^r ; integrative plasmid carrying the <i>Aspergillus nidulans</i> acetamidase gene (<i>amdS</i>), the secretion signal sequence from the <i>S. cerevisiae</i> α factor prepropeptide and functional sites for integration at the <i>lac4</i> locus of <i>K. lactis</i> GG799	New England Biolabs
pKLE	pKLAC2 carrying the PCR product GE	This work

^a Cm^r, chloramphenicol resistant; Zeo^r, zeocin resistance.

^b DNBTA, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid (Madrid, Spain); RUG-MG, Departament of Molecular Genetics, University of Groningen (Haren, The Netherlands).

6.2.2. Growth of the recombinant LAB strains in bovine skim milk (BSM). Pasteurized BSM was heated at 65 °C for 30 min and then kept at 4 °C until further use. The milk was pre-heated and seeded with a loop of a frozen stock of the *Lb. casei* CECT475 cells transformed with pMG36c, pCG and pCGSP that were grown at 33 °C, 37 °C and 40 °C for 24 h. A 3% (v/v) inoculum of the grown pre-cultures was then added to 200 ml of BSM, which were further distributed into two sterile flasks (100 ml each) and incubated at the same temperature as the corresponding pre-culture. One of the flasks was used for the continuous measurement of the pH during 48 h by a pH electrode coupled to a data logger (Knick 913; Elektronische Messgeräte, Berlin, Germany) while 3-ml samples were taken from the second culture at 0, 8, 24 and 48 h. Samples were heated at 75 °C for 1 min, vigorously stirred for 20 sec, and centrifuged at 8.000 × g for 10 min. The obtained supernatants were filtered through 0.20 µm pore-size filters (Whatman Int. Ltd., Maidstone, UK) and stored at -20 °C until further use.

6.2.3. Determination of the ACE-inhibitory activity (ACE-IA). The ACE-IA of samples of the recombinant LAB grown in BSM was determined by a fluorimetric assay performed as described by Sentandreu and Toldrá (2006) with some modifications (Quirós et al., 2009). The angiotensin converting enzyme (ACE, peptidyl-dipeptidase A, EC 3.4.15.1) was obtained from Sigma-Aldrich and the ACE working solution was added to blank (B), control (C) or samples (S). The reaction was started by adding the fluorogenic substrate o-aminobenzoylglycyl-p-nitro-L-phenylalanyl-L-proline (Abz-Gly-p-Phe(NO₂)-Pro-OH) (0.45 mM, Bachem Feinchemikalien, Bubendorf, Switzerland), and the reaction mixture was incubated at 37°C. The fluorescence of the samples was measured in a Tecan Genius Plus Fluorimeter (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland) with the Magellan™ Data Analysis Software (Tecan Group Ltd) for processing of the data. The ACE-IA of each sample was tested by triplicate. The inhibitory activity, expressed as the percentage of ACE-IA was calculated as: $100 \times (C-S)/(C-B)$. The ACE-IA was also expressed as the protein concentration required to inhibit the original ACE activity by 50% (IC₅₀). To determine the IC₅₀ value the percentage of ACE inhibition was plotted *versus* the protein concentration and a non-linear adjustment was performed as previously described (Quirós et al., 2007). The protein concentration of the BSM-derived hydrolysates was determined by the BCA protein assay (Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, IL USA).

6.2.4. Analysis of the BSM-derived hydrolysates by reversed-phase high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (RP-HPLC-MS/MS). The RP-HPLC-MS/MS analysis of the hydrolysates obtained after growth of the recombinant LAB strains in BSM was performed on an Agilent 1100 LC-MSD Trap (Agilent Technologies A/S, Naerum, Denmark) operated by LC/MSD Trap Control Software, version 4.1. Five microlitres of the centrifuged and filtered hydrolysates were injected, and peptides separated on a Zorbax 300SB C₁₈ column (2.1 × 150 mm, 5 µl of particle size, Agilent Technologies A/S). Elution was performed with a linear gradient of solvent B in A from 0% to 60% in 75 min at a flow rate of 0.25 ml/min. Solvent A was a mixture of water with 0.1 % trifluoroacetic acid (TFA) and solvent B contained 0.1% TFA in 90% acetonitrile. The mass spectrometer was operated in the positive mode with a nebuliser pressure of 50 psi, a flow of nitrogen of 9 l/min and a drying temperature of 300 °C. Auto MS(n) spectra were recorded using the standard (m/z) range 50-2200. The m/z spectral data was transformed to mass values by using the Data Analysis™ (version 2.0; Bruker Daltonik) control program. The

BioTools (version 2.1; Bruker Daltonik) was used to process the MS(n) spectra for peptide identification and sequencing.

6.2.5. ELISA for detection and quantification of the LHLPLP antihypertensive peptide. The peptide LHLPLP deduced from the amino acid sequence of bovine β -casein [f(133-138)] conjugated to the CSS amino acid residues (NH₂-CSSLHLPLP-COOH) (abbreviated as PL), was designed as the antigen for generation of antibodies of predetermined specificity against LHLPLP. The synthetic peptide PL, obtained from Invitrogen Ltd. (Paisley, Scotland, UK), had a peptide purity >95%. This peptide was conjugated to the keyhole limpet hemocyanin (KLH) carrier protein as a PL-KLH conjugate (1:2 w/w) using the components of the Imject[®] Maleimide Activated mKLH Kit (Perbio Science, Rockford, IL, USA), for use as the immunogen. Rabbits (New Zealand White females) were immunized with PL-KLH, as previously described (Gutiérrez et al., 2004). Blood samples were maintained overnight at 4 °C, centrifuged at 1,000 × *g* for 15 min and the resulting serum stored at -20 °C until further use. A non-competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (NCI-ELISA) for antiserum titration and determination of antiserum specificity and sensitivity was performed as described previously (Martínez et al., 1998; Gutiérrez et al., 2004). A competitive indirect ELISA (CI-ELISA) was also developed to detect and quantify LHLPLP in the BSM-derived hydrolysates. Briefly, wells of flat-bottom polystyrene microtiter plates (Maxisorp, Nunc, Roskilde, Denmark) were coated overnight (4 °C) with 100 μ l of purified bovine β -casein (Sigma) at 2 μ g/ml in 0.1 M sodium carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6 (coating buffer) and then washed three times with a washing solution (0.05% Tween 20 in 0.01 M phosphate-buffered saline, pH 7.4, PBS). Wells were blocked at 37 °C for 1 h with 300 μ l of 1% (w/v) ovalbumin (OA) grade III (Sigma) in PBS and then washed six times. Next, 50 μ l of the analytes were added to the plates and simultaneously incubated with 50 μ l of the antiserum (diluted 1:100 in PBS) at 37 °C for 1 h. After the washing step, 100 μ l of the goat anti-rabbit IgG peroxidase conjugate (Cappel Laboratories, West Chester, PA, USA) diluted 1:500 in OA-PBS were added, and the plates incubated at 37 °C for 30 min and further washed eight times. The amount of bound peroxidase was determined with ABTS (2,2'-azino-bis[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid]) (Sigma) as the substrate by measuring the absorbance of the wells at 405 nm with a Labsystems iEMS reader (Labsystems, Helsinki, Finland), equipped with a built-in software package for data analysis (Genesis version 1.60). Competition curves were obtained by plotting absorbance against the logarithm of the analyte concentration. The low molecular mass fraction of the BSM-derived hydrolysates, used as the analytes in the CI-ELISA, was obtained after centrifugation and filtration of the hydrolysates through 3 kDa cut-off membrane filters (Amicon ultra-4, Millipore, Billerica, MA, USA). Purified bovine β -casein and purified bovine κ -casein obtained from Sigma, and the LHLPLP and LHLPLPL synthetic peptides obtained by conventional Fmoc (fluorenyl-methoxycarbonyl) solid-phase synthesis with a 431A peptide synthesizer (Applied Biosystems Inc., Überlingen, Germany), were also used as immunochemical reagents and analytes in the NCI-ELISA and CI-ELISA developed in this work.

6.2.6. Cloning of *gelE* in *P. pastoris* X-33A and *K. lactis* GG799. Primers PKGE-F (5'-AAGAATTCTCGAGAAAAGAGAAGAACAAGTTTATTCAGAAAGTGAAGTTTC-3') and PKGE-R (5'-ATAAGTTGCGGCCGCTAATCATTGACCAGAACAGATTCACTTGTTG-3'), with sites for restriction enzymes underscored, were used for PCR amplification from total genomic DNA of

E. faecalis DBH18 (Sánchez et al., 2007) of a 1,480-bp *Xho*I/*Not*I fragment (GE) carrying the α -factor Kex-2 signal-protease cleavage site without the Glu-Ala spacer, fused to the *GelE* proenzyme (*gelE* without its signal sequence). Similarly, primers PKGEM-F (5'-AAGAATTCTCGAGAAAAGAGTCGGTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTC-3') and PKGE-R, with sites for restriction enzymes underscored, were used for PCR amplification from total genomic DNA of *E. faecalis* DBH18 of a 994-bp *Xho*I/*Not*I fragment (MGE) carrying the α -factor Kex-2 signal-protease cleavage site without the Glu-Ala spacer, fused to mature *GelE* (*gelE* without its signal sequence and prosequence). After digestion of the GE and MGE fragments with the appropriate restriction enzymes the resulting *Xho*I-*Not*I fragments were ligated into the pPICZ α A and pKLAC2 vectors, digested with the same enzymes, to generate the recombinant plasmids pPICGE, pPICMGE and pKLGE. Competent *E. coli* JM109 cells were transformed with pPICGE, pPICMGE and pKLGE and the resulting transformants confirmed by PCR and sequencing of the inserts. Purified pPICGE and pPICMGE were linearized with *Sac*I and used to transform *P. pastoris* X-33 whereas purified pKLGE was linearized with *Sac*II and used to transform *K. lactis* GG799. The *P. pastoris* X-33GE and *P. pastoris* X-33MGE derivatives were selected on YPD plates supplemented with Zeo (100 μ g/ml) and sorbitol (1 M) while the *K. lactis* GG799GE derivatives were selected on YCB (New England Biolabs) plates supplemented with Tris-HCl Buffer (30 mM) and acetamide (5 mM). The plates were incubated at 30 °C for 3 days. The integration of pPICGE, pPICMGE and pKLGE into the chromosomal 5'AOX1 region of *P. pastoris* X-33GE and *P. pastoris* X-33MGE and to the chromosomal LAC4 sequence of *K. lactis* GG799GE, respectively, was determined by PCR and sequencing of the inserts.

The caseinolytic activity of the selected *P. pastoris* X-33GE, *P. pastoris* X-33MGE and *K. lactis* GG799GE derivatives was screened by a streak-on-agar test (STOAT). Briefly, the *P. pastoris* X-33GE and *P. pastoris* X-33MGE derivatives were streaked onto the surface of BMMY buffered methanol complex medium plates (1% yeast extract, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate (pH 6), 1.34% yeast nitrogen base (YNB) without amino acids, 4x10⁻⁵% biotin, 0.5% methanol), whereas the *K. lactis* GG799GE derivatives were streaked onto YPGal plates (1% yeast extract, 2% peptone and 2% galactose) and grown at 30 °C for 24 h. Subsequently, 40 ml of soft-agar containing 1.5% BSM (v/v) were poured over the plates which were then incubated at 30 °C overnight. The proteolytic activity of cell-free culture supernatants of the recombinant *P. pastoris* and *K. lactis* derivatives, grown under conditions allowing the production of recombinant proteins (Borrero et al., 2012), was determined by the spectrophotometric quantification of stained soluble peptides released from the Hide Powder Azure (HPA) substrate (Sigma). For this purpose, the HPA substrate was resuspended in 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4) buffer to a final concentration of 15 μ l/ml. Then, 150 μ l of culture supernatants were added to 500 μ l of the HPA solution and the mixtures incubated with shaking at 37 °C for 2 h. The colorimetric reaction was stopped by placing the mixtures on ice and the samples were further centrifuged at 3,000 $\times g$ and 4 °C for 5 min. Finally, the absorbance of the stained soluble peptides was measured at 595 nm and the proteolytic activity expressed as proteolytic units (PU) due to the increase of the absorbance of the samples with time (OD₅₉₅/ml/h).

6.3. RESULTS

6.3.1. Caseinolytic activity, growth characteristics, and ACE-inhibitory activity (ACE-IA) of the recombinant LAB strains grown in bovine skim milk (BSM). From the LAB strains evaluated in this work only *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 and *Lb. casei* CECT475, transformed with pCG (*gelE*) or pCGSP (*gelE-SprE*), and *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403, transformed with pCGSP, showed a defined caseinolytic activity during growth in TH-BSM plates (Fig. 6.1).

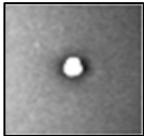
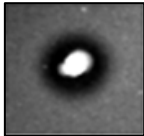
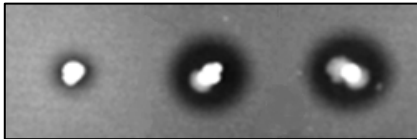
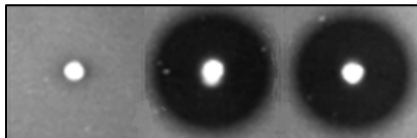
Strains	Plasmid		
	pMG36c	pCG	pCGSP
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403			
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NZ9000			
<i>Lb. casei</i> CECT475			

Fig. 6.1. Caseinolytic activity of LAB transformed with plasmids pMG36c, pCG and pCGSP in Todd Hewitt-bovine skim milk (TH-BSM) plates.

As expected, no caseinolytic activity was observed with the LAB strains transformed with plasmid pMG36c. However, the caseinolytic activity of *Lb. casei* CECT475 (pCG) and *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) was much higher than that of the recombinant lactococcal strains. Due to its high caseinolytic activity the recombinant *Lb. casei* CECT475 (pMG36c), *Lb. casei* CECT475 (pCG) and *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) were further grown in BSM at 33, 37 and 40 °C with determination of the pH and the ACE-IA of the BSM-derived hydrolysates. All the *Lb. casei* CECT475 derivatives decreased the pH of the BSM at values close to or below 4.5 with kinetic differences related to the temperature of growth and the *Lb. casei* CECT475 derivative (Fig. 6.2).

On the other hand, determination of the ACE-IA of the BSM-hydrolysates revealed that the percentage of inhibition of ACE depended on the temperature and time of growth (Fig. 6.2). The best percentages of ACE-IA (> 86.9%) corresponded to BSM-hydrolysates from *Lb. casei* CECT475 (pCG) and *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) grown at 37 °C (Fig. 6.2B).

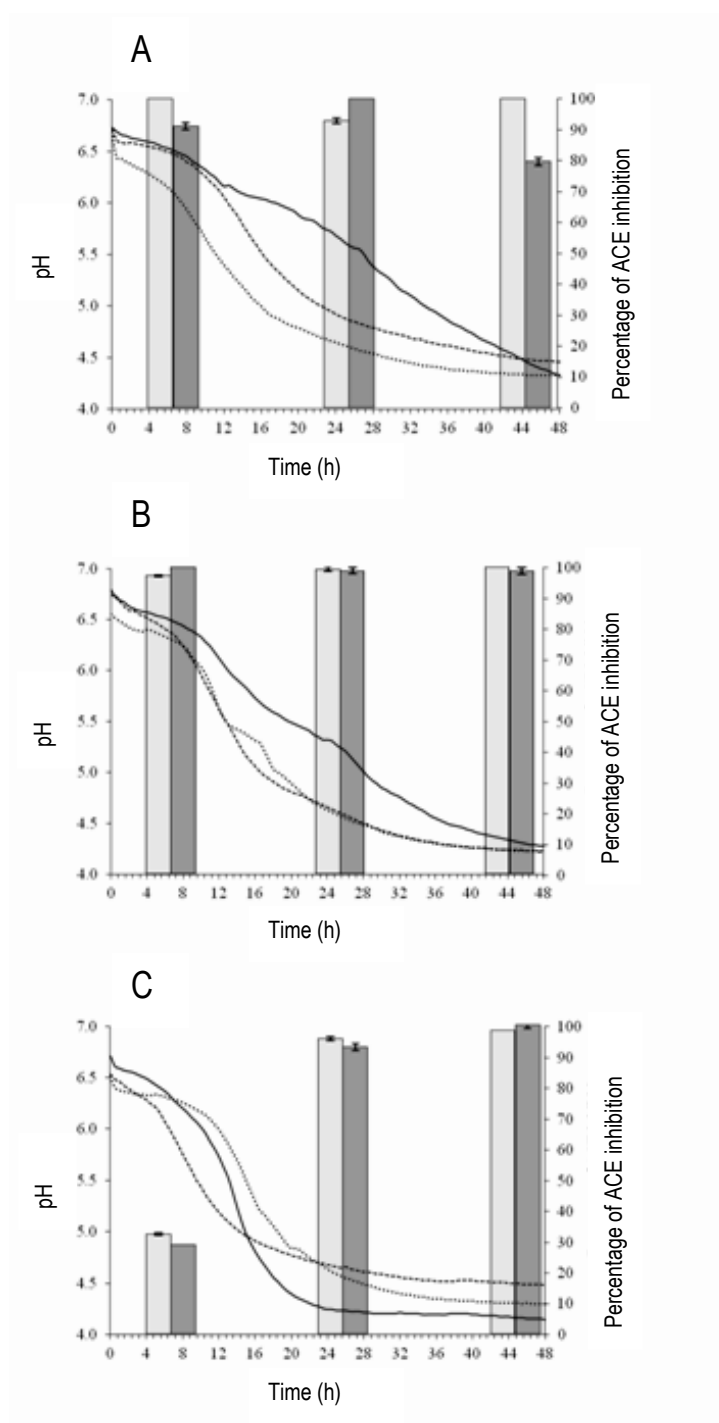


Fig. 6.2. Determination of the pH and ACE-inhibitory activity of bovine skim milk (BSM)-derived samples from *Lb. casei* CECT475 (pMG36c) ____, *Lb. casei* CECT475 (pCG), and *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) _ _ _ grown in BSM at 33 °C (A), 37 °C (B) and 40 °C (C). The ACE-IA of milk samples from *Lb. casei* CECT475 (pCG) and *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) is shown in light and dark grey columns, respectively.

The IC₅₀ of the BSM-hydrolysates produced by all the *Lb. casei* CECT475 recombinants after 0, 12, 24 and 48 h of growth in BSM at 37 °C is shown in **Table 6.2**. No measurable ACE-IA was observed for *Lb. casei* CECT475 (pMG36c), while the hydrolysates produced by *Lb. casei* CECT475 (pCG) and *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) showed a high ACE-IA, with IC₅₀ values ranging from 53.1±6.1 to 13.1±0.7 µg protein/ml (**Table 6.2**).

Table 6.2. ACE-inhibitory activity (ACE-IA)^a of supernatants of recombinant *Lb. casei* CECT475 derivatives grown at 37 °C in bovine skim milk (BSM).

Strain	IC ₅₀ (µg protein/ml)			
	0 h	12 h	24 h	48 h
<i>Lb. casei</i> CECT475 (pMG36c)	NA	NA	NA	NA
<i>Lb. casei</i> CECT475 (pCG)	NA	53.1 ± 6.1	21.4 ± 2.2	13.1 ± 0.7
<i>Lb. casei</i> CECT475 (pCGSP)	NA	27.3 ± 3.8	19.9 ± 1.9	20.5 ± 3.4

NA: No Activity.

^a ACE-inhibitory activity (ACE-IA) expressed as IC₅₀ (µg protein/ml). Data are mean from three independent determinations in triplicate.

6.3.2. Peptide profiles and identification of major peptide fragments in BSM-derived hydrolysates of *Lb. casei* CECT475 (pCG) and *Lb. casei* CECT475 (pCGSP). The peptide profiles originated by growth of *Lb. casei* CECT475 (pCG) and *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) in BSM at 37 °C for 0, 12, 24 and 48 h were determined by RP-HPLC. The two analyzed *Lb. casei* CECT475 derivatives showed similar peptide profiles, although the hydrolysates from *Lb. casei* CECT475 (pCG) contained peptide fragments of slightly higher absorbance after 24 and 48 h of growth (**Fig. 6.3**).

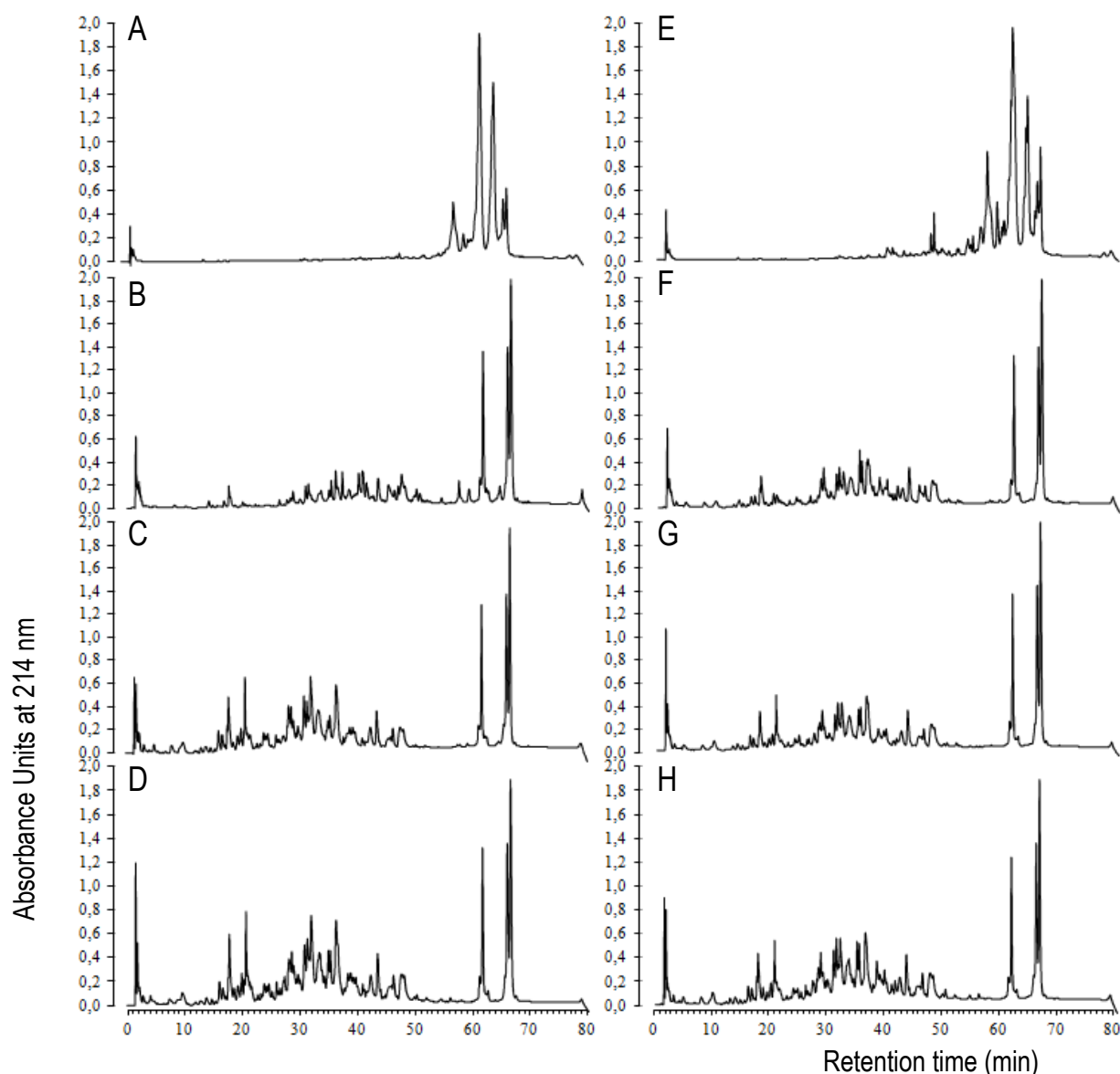


Figure 6.3. Peptide profiles by RP-HPLC of BSM-derived hydrolysates from *Lb. casei* CECT475 (pCG) (A to D) and *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) (E to H) after 0 h (A and E), 12 h (B and F), 24 h (C, G) and 48 h (D and H) of growth at 37 °C.

The RP-HPLC-MS/MS analysis of the BSM-derived hydrolysates of *Lb. casei* CECT475 (pCG) and *Lb. casei* CECT475 (pCGSP), grown at 37 °C in in BSM, permitted the identification of 24 major peptide fragments, 21 of which corresponded to bovine β -casein fragments and 3 to α_{s1} -casein fragments (**Table 6.3**), including peptides with previously reported ACE-IA, antihypertensive, and antioxidant activity.

Table 6.3. Major peptide fragments in supernatants of recombinant *Lb. casei* CECT475 derivatives grown at 37 °C in bovine skim milk (BSM).

Observed mass	Calculated mass ^a	Protein fragment	Peptide sequence	Previously described ACE-inhibitory peptides (ACE-IP) ^b	Recombinant <i>Lb. casei</i> CECT475 derivative
384.2	384.245	β -CN f(197-200)	VLGP	-----	6
561.2	561.320	β -CN f(165-169)	LSQSK	-----	6
656.5	656.397	β -CN f(82-87)	VVPPF	VVPPF	2,3,4,5,6
674.3	674.331	β -CN f(1-5)	RELEE	-----	3,5,6
680.3	680.320	β -CN f(52-57)	FAQTQS	-----	1,3,4,6
688.4	688.434	β -CN f(133-138)	LHLPL	LHLPLP	1,2,3,4,5,6
697.2	697.299	β -CN f(119-124)	FTESQS	-----	4,5
761.3	761.403	β -CN f(191-196)	LLYQEP	-----	4,5
772.4	772.386	β -CN f(88-94)	LQPEVMG	-----	1,4,5
779.4	779.498	β -CN f(170-176)	VLPVPQK	-----	1,2,3,4,5,6
801.6	801.519	β -CN f(133-139)	LHLPLPL	LHLPLPL	1,2,3,4,5,6
849.7	849.478	β -CN f(45-51)	LQDKHP	DKHP	5,6
903.3	903.462	β -CN f(125-132)	LTLTDVEN	-----	2,3,5
997.0	996.619	β -CN f(201-209)	VRGPFPIV	VRGPFPIV	2,3,4,5,6
1,086.9	1,086.582	β -CN f(88-97)	LQPEVMGVSK	-----	1,4,5,7
1,172.5	1,172.572	β -CN f(177-186)	AVYPQRDMP	-----	4,5,6
1,196.4	1,196.688	β -CN f(77-87)	LTQTPWVPPF	VVPPF	1,2,3,4,5,6
1,322.6	1,322.799	β -CN f(165-176)	LSQSKVLPVPQK	-----	1,4,5,6
1,362.2	1,362.336	β -CN f(197-209)	VLGPVRGPFPIV	VRGPFPIV	1,5,6
1,467.9	1,467.714	β -CN f(143-154)	WMHQPHQPLPPT	-----	1,3,4,5,6
1,485.6	1,486.163	β -CN f(12-22)	IVESLSSEES	-----	4
343.4	343.266	α_{S1} -CN f(181-183)	DIP	-----	4,5
633.4	633.378	α_{S1} -CN f(1-5)	RPKHP	-----	1,4,5
656.5	656.477	α_{S1} -CN f(99-103)	LRLKK	-----	2,3

^a: Monoisotopic mass^b: Previously described ACE-inhibitory peptides (ACE-IP) with ACE-IA or sharing, at least, three C-terminal residues with those found in this study.^c: Recombinant strains: 1. *Lb. casei* CECT475 (pCG) 12 h; 2. *Lb. casei* CECT475 (pCG) 24 h; 3. *Lb. casei* CECT475 (pCG) 48 h; 4. *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) 12 h; 5. *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) 24 h; 6. *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) 48 h.

6.3.3. Detection and quantification of the antihypertensive peptide LHLPLP produced by the recombinant *Lb. casei* CECT475 derivatives. The specificity of the rabbit polyclonal anti-PL-KLH antibodies for the peptide LHLPLP was evaluated by a NCI-ELISA against purified bovine β -casein, bovine skim milk (BSM), and purified bovine κ -casein. The anti-PL-KLH antibodies showed high immunochemical reactivity against purified bovine β -casein and BSM, but a negligible immunoreactivity against purified bovine κ -casein (**Fig. 6.4A**). A CI-ELISA was also developed to determine the specificity of the anti-PL-KLH antibodies for peptide LHLPLP. In this assay, the plates were coated with purified bovine β -casein that competed with peptide LHLPLP (bovine β -casein [f(133-138)]) or peptide LHLPLPL (bovine β -casein [f(133-139)]) for binding to the anti-PL-KLH antibodies. As shown in **Fig. 6.4B**, peptide LHLPLPL did not effectively compete with bovine β -casein for binding to the anti-PL-KLH antibodies, while the amount of peptide LHLPLP required for 50% binding inhibition of bovine β -casein to the anti-PL-KLH antibodies was about 5 $\mu\text{g/ml}$. On the other hand, the detection limit for peptide LHLPLP was about 0.1 $\mu\text{g/ml}$, which confirms the high affinity of the generated anti-PL-KLH antibodies for this peptide.

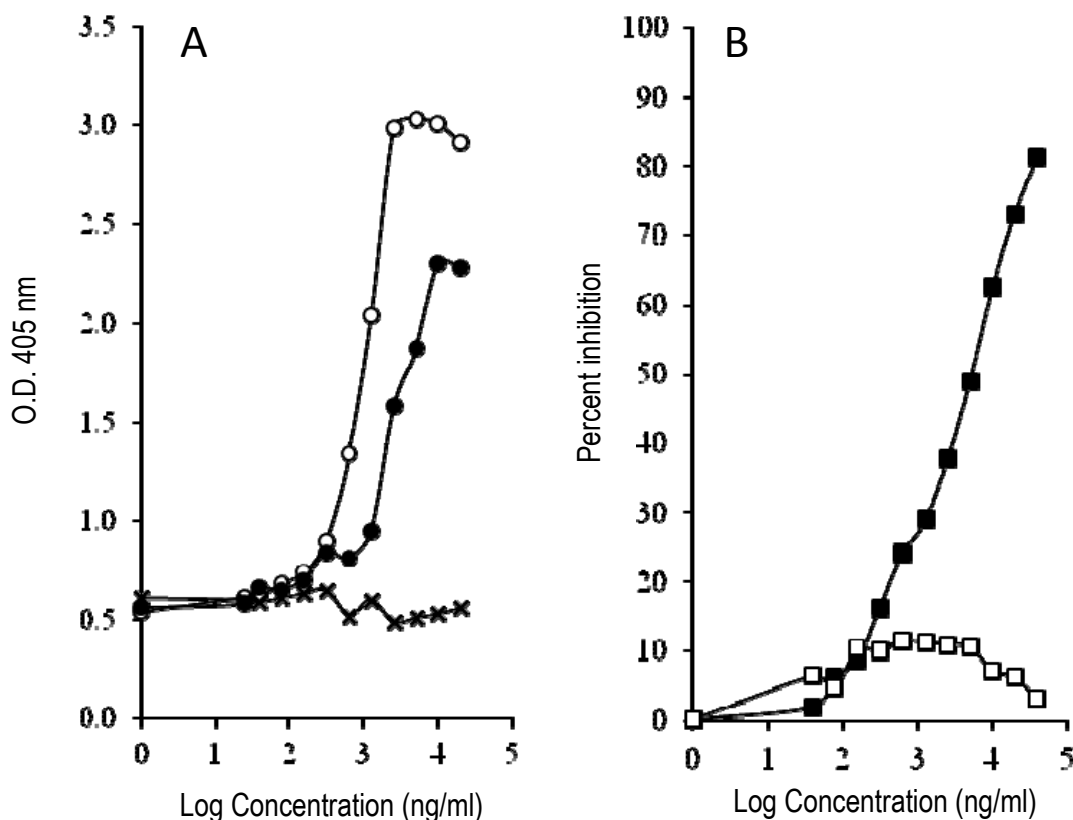


Fig. 6.4. (A) NCI-ELISA for detection of LHLPLP in purified bovine β -casein (○), bovine skim milk (BSM) (●) and purified bovine κ -casein (x). (B) CI-ELISA for detection and quantification of LHLPLP (■) and LHLPLPL (□).

Furthermore, this CI-ELISA has permitted to determine the amount of peptide LHLPLP in the BSM-derived hydrolysates of *Lb. casei* CECT475 (pCG) and *Lb. casei* CECT475 (pCGSP), as well as to determine the correlation among their ACE-IA and the amount of LHLPLP in these hydrolysates (**Table 6.4**).

Table 6.4. ACE-inhibitory activity (ACE-IA)^a and amount of LHLPLP^b in supernatants of *Lb. casei* CECT475 (pCG) and *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) grown at 37 °C in bovine skim milk (BSM).

Strain	Time(h) ^c	IC ₅₀ (μg protein/ml)	LHLPLP (μg/ml)
<i>Lb. casei</i> CECT475 (pCG)	0	NA	ND
	12	40.6	100
	24	21.0	250
	48	13.3	310
<i>Lb. casei</i> CECT475 (pCGSP)	0	NA	ND
	12	31.2	230
	24	20.0	230
	48	22.6	380

^a: ACE-inhibitory activity (ACE-IA) expressed as IC₅₀ (μg protein/ml). Data are mean from two independent determinations in triplicate.

^b: Amount of LHLPLP calculated by using a CI-ELISA with polyclonal antibodies specific for LHLPLP.

^c: Time of fermentation.

NA: No Activity.

ND: Not Detected.

6.3.4. Caseinolytic and proteolytic activity of the recombinant *P. pastoris* X-33GE, *P. pastoris* X-33MGE and *K. lactis* GG799GE. The amplification from *E. faecalis* DBH18 of the nucleotide sequences *gelE* without its signal sequence (fragment GE) and *gelE* without its signal sequence and prosequence (fragment MGE), and its cloning into the protein expression vectors pPICZαA and pKLAC2 permitted the generation of the *P. pastoris* X-33GE, *P. pastoris* X-33MGE and *K. lactis* GG799GE derivatives encoding the appropriate fragments by insertion in their genomes. However, when the recombinant *P. pastoris* X-33 derivatives were streaked on BMMY buffered methanol complex medium plates with BSM and *K. lactis* GG799GE was streaked onto YPGal plates with BSM, none of the streaked colonies showed a direct caseinolytic activity. Similarly, when cell-free supernatants of the recombinant yeasts were evaluated for their proteolytic activity against the HPA substrate, none of them increased the absorbance of the samples due to the liberation of stained soluble peptides.

6.4. DISCUSSION

Lactic acid bacteria (LAB) are known to produce a broad range of bioactive peptides including those with ACE-IA by the action of extracellular proteases, cell-envelope associated proteinases and intracellular peptidases (Hayes et al. 2007; Quirós et al., 2007; Pihlanto et al., 2010; Otte et

al., 2011). Recent work by our research group has also shown that recombinant *Enterococcus* spp. expressing the enterococcal proteases GelE and GelE/SprE, but not the SprE alone, release bioactive peptides with ACE-IA, antihypertensive and antioxidant activities during their growth in BSM (Gútiérrez et al., manuscript b under revision). However, since enterococci are considered responsible of nosocomial and, to a lesser extent, community-acquired infections (Willems et al., 2011), the heterologous expression of the enterococcal proteases GelE and GelE/SprE by safer LAB is of utmost interest.

In this work, transformation of LAB from the genera *Lactococcus*, *Lactobacillus* and *Streptococcus* with plasmids pCG (*gelE*) or pCGSP (*gelE-sprE*) resulted in production of a caseinolytic activity only by the *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403, *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 and *Lb. casei* CECT475 recombinants (**Fig. 6.1**). The heterologous expression of GelE by *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9800 has been previously described (Waters et al., 2003). However, the low success in the generation of LAB recombinants with caseinolytic activity, as observed in this work, could be ascribed to the use of non-optimal LAB competent cells or transformation conditions, the inefficient recognition of the signal peptide (SP) of GelE and GelE/SprE by signal proteases of the heterologous hosts, impairing their processing and transport, and/or the toxicity of the heterologous proteases to the transformed cells. Nevertheless, the unsuccessful production of GelE by recombinant *E. coli* cells over-expressing *gelE* has been also frequently reported (Collin and Olsen, 2000; Waters et al., 2003; Hancock and Perego, 2004).

Despite the observed caseinolytic activity by the *L. lactis* recombinants, the loss of the acquired activity by *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 (pCGSP) and the unusually slow pH decrease during growth of *L. lactis* NZ9000 (pCG) in BSM (results not shown), hamper the use of this species as potential cell factories for expression of the cloned enterococcal proteases. For this reason, only the *Lb. casei* CECT475 derivatives were selected for further characterization of their recombinant protease production. Although a higher decrease in the pH of the BSM-derived hydrolysates is observed during growth of the *Lb. casei* CECT475 recombinants at 40 °C, the production of hydrolysates of high ACE-IA occurs during growth of *Lb. casei* CECT475 (pCG) and *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) at 37 °C (**Fig. 6.2**). Low IC₅₀ values, corresponding to high ACE-IA, were also observed in the hydrolysates of *Lb. casei* CECT475 (pCG) and *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) grown at 37 °C in BSM (**Table 6.2**). IC₅₀ values of similar magnitude have been reported for *E. faecalis* strains of food, environmental and clinical origin and for the recombinant *Enterococcus* spp. expressing GelE or GelE/SprE (Muguerza et al., 2006; Gutiérrez et al., manuscripts a and b under review). Many strains of *Lb. casei*, which are frequently used as probiotics, have shown ACE-IA and antithrombotic activities; however, these traits are strain specific and also depend on the substrate and the fermentation conditions (Rojas-Ronquillo et al., 2012). The *Lb. casei* Shirota (Yakult) and *Lb. casei* Immunitas (Danone) are also strains with beneficial health effects and commercial applications (Vasiljevic and Shah, 2008). Similarly, *Lb. casei* CECT475 and orange fiber have been evaluated in the production of fermented milks and Spanish dry-cured sausages containing this probiotic strain (Sayes-Barberá et al., 2012). *Lb. casei* BL23 has been also reported to have immunomodulatory probiotic properties (Rochat et al., 2007). Thus, the ability of recombinant *Lb. casei* CECT475 to generate BSM-derived

hydrolysates with high ACE-IA is a relevant characteristic that could complement other metabolic traits in other *Lb. casei* strains or LAB of interest.

The peptide profiles of the BSM-derived hydrolysates of *Lb. casei* CECT475 (pCG) and *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) revealed a large number of peptide fragments (**Fig. 6.3**), responsible of their high ACE-IA (**Table 6.2**). Furthermore, RP-HPLC-MS/MS analysis of these hydrolysates permitted the identification of some of the major peptide fragments (**Table 6.3**). In this context, some of the identified peptides derived from bovine β -casein such as LQDKIHP [*f*(47-51)], LTQTPVVPPF [*f*(77-87)], VVVPPF [*f*(99-103)], LHLPLP [*f*(133-138)], LHLPLPL [*f*(133-139)], VLGPVRGPFPIIV [*f*(197-209)], and VRGPFPIIV [*f*(201-209)], have been reported to show ACE-IA or share, at least, three C-terminal residues with those with ACE-IA (Miguel et al., 2006; Quirós et al., 2007; Gútiérrez et al., manuscript a under review). Most of the identified ACE-IP are rich in the amino acid proline, one of the most favourable residues for peptide binding to the active site of ACE. Interestingly, the peptide LHLPLP present in all BSM-derived hydrolysates shows a potent antihypertensive activity *in vivo* in spontaneously hypertensive rats (SHR) (Miguel et al., 2006; Quirós et al., 2009). On the other hand, the peptide VLPVPQK [β -casein, *f*(170-176)], previously reported as antioxidant (Rival et al., 2001), has been also identified among the major peptides present in all the hydrolysates (**Table 6.3**).

It is known that peptide fragments released from bovine β -casein and α_{s1} -casein by GeIE implicate the hydrolysis of peptide bonds with hydrophobic amino acid residues (Mäkinen et al., 1989), while the fragments produced by SprE show a glutamic acid (E)-Xaa cleavage site (Kawalec et al., 2005). According to this, the pattern of β -casein and α_{s1} -casein breakdown and the release of bioactive peptides observed in the BSM-derived hydrolysates produced by *Lb. casei* CECT475 (pCG) and *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) may correspond to the activity of the strongly hydrophobic GeIE from *E. faecalis* DBH18. However, SprE does not seem to be involved in the production of ACE-IP with ACE-IA and, therefore, does not have an additive effect with GeIE in the release of ACE-IP, at least in our assay conditions.

In contrast to many studies that report the production and quantification of ACE-IP and antihypertensive peptides using chromatographic and spectrometric techniques, in this study we have developed a CI-ELISA to detect and quantify the peptide LHLPLP, an ACE-IP with proven antihypertensive activity, in the <3 kDa filtered samples from the BSM-derived hydrolysates of *Lb. casei* CECT475 (pCG) and *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) (**Table 6.4**). The CI-ELISA method developed in this work permits the detection and quantification of LHLPLP in concentrations above 0.1 μ g/ml; therefore this method represents a sensitive, rapid and cheaper alternative to other analytical techniques, including RP-HPLC-MS/MS for detection and quantification of bioactive peptides (Quirós et al., 2006). Comparison of the results obtained by the CI-ELISA and the ACE-IA assays revealed that, although increasing amounts of LHLPLP were, in general, accompanied by an increase in the ACE-IA of the samples, there was not a simple linear relationship between these parameters (results not shown). It could happen that fluctuations in the ACE-IA of the filtered hydrolysates may be due to the loss of higher molecular mass peptides with synergic ACE-IA.

On the other hand the cloning of *gelE*, lacking its signal peptide or its signal peptide and prosequence, in expression vectors for specific protein secretion by *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799 did not permit the generation of recombinants with caseinolytic or extracellular proteolytic activity. The absence of a GelE⁺ phenotype by *P. pastoris* X-33GE, *P. pastoris* X-33MGE and *K. lactis* GG799GE could depend on the expression vector or the yeast strain (Cereghino et al., 2000; Borrero et al., 2012). In this context, differences in the promoter and the translational stop signals, the inefficient recognition of the signal proteases to recognize the signal cleavage, and deviations in the processing, maturation and/or folding of the resulting GelE, could account for the absence of caseinolytic or extracellular proteolytic activity by the generated recombinant yeasts (Böer et al., 2007; Idiris et al., 2010; Borrero et al., 2012). Other bottlenecks observed during recombinant protein expression by yeasts are the inability of foreign peptides to reach their native conformation or their posttranslational modifications (PTMs) to peptides with impaired biological activity (Gasser et al., 2008; Zhao and Jensen, 2009).

However, the *Lb. casei* CECT475 derivatives heterologously expressing GelE have permitted the production of BSM-derived hydrolysates with high ACE-IA, antihypertensive, and antioxidant peptides. The generation of rabbit polyclonal antibodies with predetermined specificity for peptide LHLPLP and the development of a CI-ELISA has also permitted the quantification in the BSM-derived hydrolysates of the bioactive peptide LHLPLP, with high ACE-IA and antihypertensive activity. This peptide is resistant to brush border peptidases and to stimulated gastrointestinal digestion, and elevated decreases in systolic and diastolic blood pressure are observed after administration of synthetic LHLPLP to spontaneously hypertensive rats (Quirós et al., 2007; 2009). Accordingly, filtered low molecular mass BSM-hydrolysates or purified hydrolysates enriched with LHLPLP could be attractive and valued as a functional and antihypertensive food ingredient. The evaluation of other LAB as heterologous hosts for production of GelE, as well as the use of this protease, partially purified or purified to homogeneity, would be also of interest for the potential release of ACE-IP or other bioactive peptides from meat, egg, fish, and plant substrates with novel or improved biological activities.

6.5. ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by project AGL2012-34829 from the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), by projects AGL2009-08348 and AGL2011-24643 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN), by a CENIT project (2006-2009) from the MITC-CDTI, by grant GR35-10A from the BSCH-UCM, and by grant S2009/AGR-1489 from the Comunidad de Madrid (CAM). L. Gútiez holds a fellowship (FPU) from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC), J. Borrero held a research contract from the CAM, and S. Arbulu is recipient of a fellowship from the MICINN, Spain.

6.6. REFERENCES

Aukrust, T. W., Brurberg, M. B., and Nes, I. F. (1995). Transformation of *Lactobacillus* by electroporation. *Methods Mol. Biol.* 47:201-208.

- Blomqvist, T., Steinmoen, H., and Haavarstein, L. S. (2006). Natural genetic transformation: a novel tool for efficient genetic engineering of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Env. Microbiol.* 72:6751-6756.
- Böer, E., Steinborn, G., Kunze, G., and Gellissen, G. (2007). Yeast expression platforms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77:513-523.
- Borrero, J., Jiménez, J. J., Gútiez, L., Herranz, C., Cintas, L. M., and Hernández, P. E. (2011). Protein expression vector and secretion signal peptide optimization to drive the production, secretion, and functional expression of the bacteriocin enterocin A in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 156:76-86.
- Borrero, J., Kunze, G., Jiménez, J. J., Böer, E., Gútiez, L., Herranz, C., Cintas, L. M., and Hernández, P.E. (2012). Cloning, production, and functional expression of the bacteriocin enterocin A, produced by *Enterococcus faecium* T136, by the yeasts *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, and *Arxula adeninivorans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:5956-61.
- Cereghino, G. P., and Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:45-66.
- Chopin, M. C., Chopin, A., Moillo-Bott, A., and Langella, P. (1984). Two plasmid-determined restriction and modification systems in *Streptococcus lactis*. *Plasmid* 11:260-263.
- Collin, M., and Olsen, A. (2000). Generation of a mature streptococcal cysteine proteinase is dependent on cell wall-anchored M1 protein. *Mol. Microbiol.* 36:1306-1318.
- De Leo, F., Panarese, S., Gallerani, R., and Ceci, L. R. (2009). Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides: production and implementation of functional food. *Curr. Pharm. Design.* 15:3622-3643.
- Del Papa, M. F., Hancock, L. E., Thomas, V. C., and Perego, M. (2007). Full activation of *Enterococcus faecalis* gelatinase by a C-terminal proteolytic cleavage. *J. Bacteriol.* 189:8835-8843.
- Gasser, B., Saloheimo, M., Rinas, U., Dragosits, M., Rodríguez Carmona, E., Baumann, K., Giuliani, M., Parrilli, E., Branduardi, P., Lang, C., Porro, D., Ferrer, P., Tutino, M. L., Mattanovich, D., and Villaverde, A. (2008). Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. *Microb. Cell Fact.* 7(11). doi: 10.1186/1475-2859-7-11.
- Guo, Y., Pan, D., Zeng, X., and Tanokura, M. (2009). Purification and characterization of CEP from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. *Food Chem.* 112:533-538.
- Gutiérrez, J., Criado, R., Citti, R., Martín, M., Herranz, C., Fernández, F., Cintas, L. M., and Hernández, P. E. (2004). Performance and applications of polyclonal anti-peptide antibodies with specificity for the enterococcal bacteriocin enterocin P. *Agric. Food Chem.* 52:2247-2255.
- Gútiez, L., Gómez-Sala, B., Recio, I., del Campo, R., Cintas, L. M., Herranz, C., and Hernández, P. E. *Enterococcus faecalis* strains from food, environmental, and clinical origin produce ACE-inhibitory peptides and other bioactive peptides during growth in bovine skim milk, (Manuscript a, under review).
- Gútiez, L., Borrero, J., Jiménez, J. J., Gómez-Sala, B., Recio, I., Cintas, L. M., Herranz, C., and Hernández, P. E. Genetic and biochemical evidence that gelatinase (GelE) encoded by

- Enterococcus faecalis* DBH18 produce bovine milk-derived hydrolysates with ACE-inhibitory activity, (Manuscript b, under review).
- Hancock, L. E., and Perego, M. (2004). The *Enterococcus faecalis* *fsr* two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. *J. Bacteriol.* 186:5629-5639.
- Hayes, M., Stanton, C., Slattery, H., O'Sullivan, O., Hill, C., Fitzgerald, G. F., and Ross, R. P. (2007). Casein fermentate of *Lactobacillus animalis* DPC6134 contains a range of novel propeptide angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:4658-4667.
- Hernández-Ledesma, B., Contreras, M. M., and Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods. *Adv. Colloid Interface Sci.* 165:23-35.
- Holo, H., and Nes, I. F. (1989). High frequency transformation by electroporation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:3119-3123.
- Idiris, A., Tohda, H., Kumaga, H., and Takegawa, K. (2010). Engineering of protein secretion in yeasts: strategies and impact on protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86:403-417.
- Kawalec, M., Potempa, J., Moon, J. L., Travis, J., and Murray, B. E. (2005). Molecular diversity of a putative virulence factor: purification and characterization of isoforms of an extracellular serine glutamyl endopeptidase of *Enterococcus faecalis* with different enzymatic activities. *J. Bacteriol.* 187:266-275.
- Kuipers, O. P., de Ruyter, P. G., Kleerevezem, M., and de Vos, W. M. (1998). Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 64:15-21.
- Mäkinen, P. L., Clewell, D. B., An, F., and Mäkinen, K. K. (1989). Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metalloendopeptidase ("gelatinase") from *Streptococcus faecalis* (OG1-10). *J. Biol. Chem.* 264:3325-3334.
- Martínez, J. M., Martínez, M. L., Suárez, A., Herranz, C., Casaus, P., Cintas, L. M., Rodríguez, L. M., and Hernández, P. E. (1998). Generation of polyclonal antibodies of predetermined specificity against pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4536-4545.
- Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., Recio, I., and Hernández-Ledesma, B. (2012). Antihypertensive peptides from proteins: a review. *Food Funct.* 3:350-361.
- Miguel, M., Recio, I., Ramos, M., Delgado, M. A., and Aleixandre, M. A. (2006). Antihypertensive effect of peptides obtained from *Enterococcus faecalis*-fermented milk in rats. *J. Dairy Sci.* 89:3352-3359.
- Mills, S., Ross, R. P., Hill, C., Fitzgerald, G. F., and Stanton, C. (2011). Milk intelligence: mining milk for bioactive substances associated with human health. *Int. Dairy J.* 21:377-401.
- Minervini, F., Algaron, F., Rizzello, C. G., Fox, P. F., Monnet, V., and Gobbetti, M. (2003). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. *App. Environ. Microbiol.* 69:5297-5305.
- Muguerza, B., Ramos, M., Sánchez, E., Manso, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A., Delgado, M. A., and Recio, I. (2006). Antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk. *Int. Dairy J.* 16:61-69.
- Otte, J., Lenhard, T., Flambard, B., and Sørensen, K. I. (2011). Influence of fermentation temperature and autolysis on ACE-inhibitory activity and peptide profiles of milk fermented

- by selected strains of *Lactobacillus helveticus* and *Lactococcus lactis*. *Int. Dairy J.* 21:229-238.
- Phelan, M., and Kerins, D. (2011). The potential role of milk-derived peptides in cardiovascular disease. *Food Funct.* 2:153-167.
- Pihlanto, A., Virtanen, T., and Korhonen, K. (2010). Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. *Int. Dairy J.* 20:3-10.
- Qin, X., Singh, K. V., Weinstock, G. M., and Murray, B. E. (2000). Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infect. Immun.* 68:2579-2586.
- Quirós, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A., and Recio, I. (2006). Determination of the antihypertensive peptide LHLPLP in fermented milk by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Dairy. Sci.* 89:4527-4535.
- Quirós, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A., and Recio, I. (2007). Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *Int. Dairy J.* 17:33-41.
- Quirós, A., Contreras, M. M., Ramos, M., Amigo, L., and Recio, I. (2009). Stability to gastrointestinal enzymes and structure-activity relationship of β -casein-peptides with antihypertensive properties. *Peptides* 30:1848-1853.
- Rival, S. G., Boeriu, C. G., and Wichers, H. J. (2001). Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *J. Agric. Food Chem.* 49(1):295-302.
- Rochat, T., Bermúdez-Humarán, L., Gratadoux, J. J., Fourage, C., Hoebler, C., Corthier, G., and Langella, P. (2007). Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus casei* BL23 producing or not a manganese-dependant catalase on DSS-induced colitis in mice. *Microb. Cell Fact.* 6:2859-6-22.
- Rojas-Ronquillo, R., Cruz-Guerrero, A., Flores-Nájera, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., Reyes-Grajeda, J. P., Jiménez-Guzmán, J., and García-Garibay, M. (2012). Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota. *Int. Dairy J.* 26:147-154.
- Ryan, J. T., Ross, R. P., Bolton, D., Fitzgerald, G. F., and Stanton, C. (2011). Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. *Nutrients* 3:765-791.
- Sánchez, J., Basanta, A., Gómez-Sala, B., Herranz, C., Cintas, L. M., and Hernández, P. E. (2007). Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Int. J. Food Microbiol.* 117:295-305.
- Sánchez, D., Kassan, M., Contreras, M. M., Carrón, R., Recio, I., Montero, M. J., and Sevilla, M. A. (2011). Long-term intake of a milk casein hydrolysate attenuates the development of hypertension and involves cardiovascular benefits. *Pharmacol. Res.* 63:398-404.
- Sayas-Barberá, E., Viuda-Martos, M., Fernández-López, F., Pérez-Alvarez, J. A., and Sendra, E. (2012). Combined use of a probiotic culture and citrus fiber in a traditional sausage "Longaniza de Pascua". *Food Control* 27:343-350.
- Sentandreu, M. A., and Toldrá, F. (2006). A fluorescence-based protocol for quantifying angiotensin-converting enzyme activity. *Nat. Protoc.* 1:2423-2427.

- Teixeira, N., Santos, S., Marujo, P., Yokohata, R., Iyer, V. S., Nakayama, J., Hancock, L. E., Serror, P., and Silva Lopes, M. F. (2012). The incongruent gelatinase genotype and phenotype in *Enterococcus faecalis* are due to shutting off the ability to respond to the gelatinase biosynthesis-activating pheromone (GBAP) quorum-sensing signal. *Microbiology* 158:519-528.
- van de Guchte, M., van der Vossen, J. M., Kok, J., and Venema, G. (1989). Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:224-228.
- Vasiljevic, T., and Shah, N. P. (2008). Probiotics- From Metchnikoff to bioactives. *Int. Dairy J.* 18:714-728.
- Waters, C. M., Antiporta, M. H., Murray, B. E., and Dunny, G. M. (2003). Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. *J. Bacteriol.* 185:3613-3623.
- Willems, R. J. L., Hanage, W. P., Bessen, D. E., and Feil, E. J. (2011). Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 35: 872-900.
- Yamamoto, N., Akino, A., and Takano, T. (1994). Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.* 77:917-922.
- Zhao, Y., and Jensen, O. N. (2009). Modification-specific proteomics: strategies for characterization of post-translational modifications using enrichment techniques. *Proteomics* 9:4362-4641.

CAPÍTULO *CHAPTER*

7

**La gelatinasa (GeE) purificada libera
péptidos inhibidores de la enzima
convertidora de la angiotensina (ECA)
por hidrólisis de la leche desnatada de
vaca**

***Purified gelatinase (GeE) releases
angiotensin converting enzyme (ACE)-
inhibitory peptides from bovine skim milk***

ABSTRACT

Gelatinase (GelE), a strongly hydrophobic metalloendopeptidase produced by *Enterococcus faecalis*, was purified from *E. faecalis* DBH18, a natural GelE-producer strain, and from *Lactobacillus casei* CECT475 (pCG), a recombinant GelE-producer strain. The specific proteolytic activity and yield of the purified GelE from *E. faecalis* DBH18 was higher than that of the GelE purified from *Lb. casei* CECT475 (pCG). The hydrolysis of bovine skim milk (BSM), either by fermentation with *E. faecalis* DBH18 or *Lb. casei* CECT475 (pCG) or by digestion with purified GelE from these bacterial producers, generated BSM-derived hydrolysates of high angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitory activity (ACE-IA). However, the use of purified GelE permitted lower incubation times than using microbial cultures for production of milk-derived hydrolysates of high ACE-IA. Analysis of the fermented and digested BSM-derived hydrolysates by MALDI-TOF/MS permitted the identification of major peptide fragments with previously reported ACE-IA and antihypertensive activity. Moreover, the purified GelE from *E. faecalis* DBH18 generated the BSM-derived hydrolysates with the highest ACE-IA and greatest production of the antihypertensive peptide LHLPLP.

Keywords: Gelatinase (GelE), *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus casei*, ACE-inhibitory activity, ACE-inhibitory peptides, bioactive peptides

7.1. INTRODUCTION

During the last decades an increasing number of studies have evidenced the benefits of food protein intake in human health besides their nutritional and energetic role. Food proteins and, specifically milk proteins, constitute a rich source of bioactive peptides which can exert a wide range of biological activities such as antihypertensive, antithrombotic, opioid, antimicrobial, cytomodulatory, immunomodulatory, and others (Hayes et al., 2007). Among the bioactive peptides, the angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides (ACE-IP) are receiving special attention as they may decrease arterial hypertension, a risk factor for developing cardiovascular diseases (Lopez-Fandiño et al., 2006; Murray and Fitzgerald 2007; Martínez-Maqueda et al., 2012). The ACE-IP are competitive inhibitors of ACE, a key enzyme involved in the regulation of blood pressure by preventing ACE from synthesizing the potent vasoconstrictor angiotensin-II and inactivating bradykinin, a vasodilator (Seppo et al., 2003).

Most ACE-IP are encrypted within native protein precursors and proteolysis is required for their release by digestive enzymes during their gastrointestinal transit, by fermentation with lactic acid bacteria (LAB) or by hydrolysis with specific proteolytic enzymes sourced from animals, plants, and microbes (Gobbetti et al., 2004). Accordingly, many LAB and their most active proteases have been evaluated for production of milk-derived hydrolysates with ACE-IA. A number of studies have also reported the release of ACE-IP from milk or milk-derived proteins digested with proteolytic enzymes isolated from LAB like a proteinase from *Lb. helveticus* PR4, a cell wall-associated proteinase (CEP) from *Lb. helveticus* CP790, a CEP from *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL581 or a CEP purified from *L. lactis* subsp. *lactis* LB12 (Yamamoto et al., 1994; Minervini et al., 2003; Hebert et al., 2008; Guo et al., 2009). Recent reports by our research group also indicate that most, but not all, *E. faecalis* strains from food, environmental and clinical origin produce milk-derived hydrolysates with high ACE-inhibitory activity (ACE-IA) (Gútiérrez et al., manuscript a under review). They also provide the genetic and biochemical evidence of the involvement of gelatinase (GelE), produced by *E. faecalis*, in the production of bovine skim milk (BSM)-derived hydrolysates with high ACE-IA, due to the release of ACE-IP (Gútiérrez et al., manuscript b, under review).

The gelatinase (GelE), produced by *E. faecalis*, is an extracellular metalloendopeptidase with hydrolytic activity against a broad range of protein substrates and a fairly strict requirement for an hydrophobic amino acid residue (L, F, I or even W or Y) at the cleavage site of the peptide bond (Mäkinen et al., 1989; Su et al., 1991; Waters et al., 2003; Park et al., 2007, Park et al., 2008; Steck et al., 2011, Gutiérrez et al., manuscript b under review). The GelE is encoded by *gelE* whose synthesis is regulated by *fsr* (*E. faecalis* regulator), a two component quorum sensing-dependent regulatory system (Teixeira et al., 2012). The GelE, produced among other enterococci by *E. faecalis* DBH18 (Sánchez et al., 2007; GenBank nº JQ815406), is synthesized as a 509 amino acid preproenzyme with a predicted N-terminal signal peptide of 29 amino acids, a putative prosequence of 162 amino acids and the mature enzyme of a molecular mass of 30 kDa, which is further subjected to C-terminal processing for full activation of its protease activity (Del Papa et al., 2007). Although the role of GelE in virulence, pathogenicity and biofilm formation has been demonstrated in several infection models (Qin et al., 2000; Sifri et al. 2002; Park et al., 2007), it

has been also considered that GelE may also play a role, not associated to virulence, in the physiology of *E. faecalis* strains of different origins (Teixeira et al., 2012; Gútiérrez et al., manuscript a under review). Moreover, it has been also demonstrated that transformed *Enterococcus* spp. and *Lb. casei* CECT475 expressing the GelE from *E. faecalis* DBH18, produce BSM-derived hydrolysates with ACE-IA due to the production of ACE-IP (Gútiérrez et al., manuscript b under review; Gútiérrez et al., manuscript c under review).

Accordingly, we report in this work the purification of GelE from *E. faecalis* DBH18, a natural GelE-producer strain (Sánchez et al., 2007) and from *Lb. casei* CECT475 (pCG), a recombinant strain expressing GelE from *E. faecalis* DBH18 (Gútiérrez et al., manuscript c under review). We also report that purified GelE from *E. faecalis* DBH18 and *Lb. casei* CECT475 (pCG) produce BSM-derived hydrolysates with ACE-IA, due to the release of ACE-IP. MALDI-TOF/MS analysis permitted the identification of previously described ACE-IP in the BSM-derived hydrolysates while the LHLPLP peptide with antihypertensive activity was quantified by a competitive indirect ELISA (CI-ELISA).

7.2. MATERIALS AND METHODS

7.2.1. Bacterial strains and culture conditions. *Enterococcus faecalis* DBH18 (Sánchez et al., 2007) and *Lactobacillus casei* CECT475 (pCG) expressing *gelE* from *E. faecalis* DBH18 were used as the source of gelatinase (GelE), while *Lb. casei* CECT475 (pMG36c) was used as the control strain (Gútiérrez et al., manuscript c under review). The strains were propagated in MRS broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK), M17 broth (Oxoid) supplemented with 0.5% (w/v) glucose (GM17) and Todd-Hewitt broth (TH) (Oxoid) at 37 °C. Agar plates were prepared by adding 1.5% (w/v) agar to the media. When needed, chloramphenicol (Cm) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was used at 10 µg/ml. The caseinolytic activity of the cultures was examined by a stab-on-agar test (SOAT) using Todd Hewitt-bovine skim milk agar plates (TH-BSMA) made by addition of 1.5% (w/v) agar (Oxoid) to TH broth supplemented with 1.5% (v/v) of reconstituted bovine skim milk (BSM) 10% (w/v) (Oxoid), and visualization of clear zones of hydrolysis after overnight incubation of the plates at 37 °C. The caseinolytic activity of fractions derived from purification of the GelE was tested by placing a 5 µl drop onto BSM agar plates (BSMA) made by addition of 1.5% (w/v) agar to 1.5% (v/v) BSM.

7.2.2. Production of gelatinase (GelE) and determination of the gelatinase activity. Liquid cultures of MRS, GM17 and TH were seeded with a loop of a frozen stock of *E. faecalis* DBH18 and *Lb. casei* CECT475 (pCG), and then incubated overnight at 37 °C. A 1% (v/v) inoculum of every grown culture was added to 100 ml of the corresponding medium and then incubated at 37 °C. From every culture, 5 ml-samples were taken at 0, 2, 4, 6, 8, 12 and 24 h of growth, and their optical density measured at 600 nm (OD₆₀₀ nm). Then, the samples were vigorously stirred for 20 sec, centrifuged at 8,000 × g at 4 °C for 10 min, and filtered through 0.20 µm pore-size filters (Whatman Int. Ltd., Maidstone, UK) to obtain the cell-free supernatants, and stored at -20 °C until further use. The gelatinase activity of the supernatants was determined by the spectrophotometric quantification of stained soluble peptides released from the Hide Powder Azure (HPA) substrate (Sigma). For this purpose, the HPA substrate was resuspended in 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4) buffer

to a final concentration of 15 µl/ml. Then, 150 µl of culture supernatants were added to 500 µl of the HPA solution and the mixtures incubated with shaking at 37 °C for 2 h. The colorimetric reaction was stopped by placing the mixtures on ice and the samples were further centrifuged at $3,000 \times g$ and 4 °C for 5 min. Finally, the absorbance of the stained soluble peptides was measured at 595 nm and the proteolytic activity expressed as proteolytic units (PU) due to the increase of the absorbance of the samples with time ($OD_{595}/ml/h$).

7.2.3. Purification of GelE. For purification of GelE a 1% inoculum of *E. faecalis* DBH18, previously grown in GM17, was deposited into 1-L of GM17 and the same inoculum of *Lb. casei* CECT475 (pCG), previously grown in MRS, was deposited into 1-L of MRS. Cultures were grown at 37 °C for 8 h and cells removed by centrifugation at $15,000 \times g$ at 4 °C for 30 min. Proteins in the supernatants were precipitated by ammonium sulfate at 60 g/l (w/v), and after overnight precipitation in a shaker at 4 °C the samples were centrifuged at $27,500 \times g$ at 4 °C for 30 min. The resulting protein pellets were resuspended in 100 ml of 50 mM Tris-HCl with 1 mM $CaCl_2$, pH 7.8, and then applied to a Phenyl-Sepharose CL-4B column (2.5 x 17 cm) (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden) and washed with 150 ml of the resuspension buffer. Proteins were eluted with 75 ml of 50% (v/v) ethylene glycol in 50 mM Tris-HCl with 1 mM $CaCl_2$, pH 7.8. Eluted fractions of 5 ml were collected, and those displaying caseinolytic activity on BSMA plates were pooled and dialyzed extensively against 50 mM Tris-HCl with 1 mM $CaCl_2$, pH 7.8 using Slide-A-Lyzer dialysis cassettes of a molecular weight cut-off of 10 kDa (Thermo Scientific, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). The protein in the samples was concentrated to a 0.5 ml volume after filtration of the dialysates through Centricon-10 kDa membrane filters (Millipore, Billerica, MA, USA). The protein content of the fractions generated during the purification of the GelE was determined by the BCA protein assay (Pierce, Thermo Fisher Scientific) and the gelatinase activity of the samples was measured by the HPA method.

Fractions resulting from the purification of the GelE produced by *E. faecalis* DBH18 or *Lb. casei* CECT475 (pCG) were subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under reducing conditions (Laemmli, 1970). Defined protein bands of similar or lower molecular weight than that deduced from the amino acid sequence of mature GelE were submitted to in-gel trypsin digestion, and the trypsin-released peptide fragments were recovered as previously described (Shevchenko et al., 2006). The released peptides were further desalted and concentrated with C_{18} Stage tips (Empore 3M, St. Paul, MN, USA) (Rappsilber et al., 2003) for matrix-assisted laser desorption/ionization-tandem time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) analysis. The peptides were eluted with 5 µl of a 70% acetonitrile with 0.03% trifluoroacetic acid (TFA) solution, and then 1 µl of each sample was mixed 1:1 with the matrix containing 15 µg/ml of alfa-cyano-hydroxycinnamic acid. The mixtures were then applied to a matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) target plate (Bruker Daltonics, Billerica, MA). The peptides in the samples were analyzed by tandem mass spectrometry on an Ultra-Flex MALDI-tandem time of flight (MALDI-TOF/TOF) instrument (Bruker Daltonics), with peptide identification by the flexAnalysis software (Bruker Daltonics).

7.2.4. Determination of the ACE-inhibitory activity (ACE-IA) of the bovine skim milk (BSM)-derived hydrolysates. To this end, freshly made reconstituted BSM (Oxoid) was seeded with a

loop of a frozen stock of *E. faecalis* DBH18, *Lb. casei* CECT475 (pCG), and the non GelE-producer *Lb. casei* CECT475 (pMG36c). The cultures were grown at 37 °C for 24 h and a 3% (v/v) of every grown culture was then added to BSM, the cultures incubated at 37 °C, and the BSM-derived samples taken at 12, 24 and 48 h of growth of the added cultures. Reconstituted BSM was also incubated at 37 °C for 12, 24 and 48 h with a 3% (v/v) of the cell-free supernatants of *E. faecalis* DBH18 and *Lb. casei* CECT475 (pCG) cultures grown at 37 °C for 8 h in MRS and GM17, respectively. Reconstituted BSM was also incubated at 37 °C for 6, 12, and 24 h with a 3% (v/v) sample of the ammonium sulfate precipitation fraction obtained during purification of the GelE. Finally, freshly made reconstituted BSM was also incubated at 37 °C for 2, 4, 6, and 24 h with a 3% (v/v) purified GelE from *E. faecalis* DBH18 and *Lb. casei* CECT475 (pCG). The residual proteolytic activity of the BSM-derived hydrolysates was inactivated by heating at 75 °C for 1 min. Then, samples were vigorously stirred and centrifuged at 8.000 x g for 10 min, the supernatants filtered through 0.20 µm pore-size filters (Whatman), and stored at -20 °C until further use. The ACE-IA of the BSM-derived hydrolysates was determined by a fluorimetric assay performed as described by Sentandreu and Toldrá (2006), with some modifications (Quirós et al., 2009). Briefly, the angiotensin converting enzyme (ACE, peptidyl-dipeptidase A, EC 3.4.15.1) obtained from Sigma and the ACE working solution were added to blank (B), control (C) or samples (S). The reaction was started by adding the fluorogenic substrate o-aminobenzoylglycyl-p-nitro-L-phenylalanyl-L-proline (Abz-Gly-p-Phe(NO₂)-Pro-OH) (0.45 mM, Bachem Feinchemikalien, Bubendorf, Switzerland), and the reaction mixture was incubated at 37 °C. The fluorescence of the samples was measured in a Multiscan Microplate Fluorimeter (FLUOstar optima, BMG Labtech, Offenburg, Germany) with the FLUOstar (version 1.32 R2, BMG Labtech) control system for processing of the data. The activity of each sample was tested by triplicate. The inhibitory activity, expressed as the percentage of ACE-IA was calculated as: $100 \times (C-S)/(C-B)$. The ACE-IA was also expressed as the protein concentration required to inhibit the original ACE activity by 50% (IC₅₀). To determine the IC₅₀ value the percentage of ACE inhibition was plotted versus the protein concentration and a non-linear adjustment was performed as previously described (Quirós et al., 2007). The protein concentration of the BSM-derived hydrolysates was determined by the BCA protein assay (Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, IL USA).

7.2.5. Analysis of the BSM-derived hydrolysates by MALDI-TOF/MS analysis. The BSM-derived hydrolysates from fermentation of BSM with *E. faecalis*, *Lb. casei* CECT475 (pCG) or *Lb. casei* CECT475 (pMG36c), and from digestion of BSM with purified fractions from the purification of GelE were subjected to peptide MALDI-TOF/MS analysis on an Ultra-Flex MALDI-tandem time of flight (MALDI-TOF/TOF) instrument operated by the flexControl software (Bruker Daltonics). The BSM-derived hydrolysates were desalted and concentrated for analysis by MALDI-TOF/MS using C₁₈ Stage tips (Empore 3M) (Rappsilber et al., 2003). The peptides were eluted and applied to a MALDI target plate as described before. The mass range for MALDI-TOF/MS was 400 to 4,000 Da with a mass accuracy of 50 ppm. Peptide identification was carried out using the flexAnalysis software (Bruker Daltonics).

7.2.6. ELISA for detection and quantification of the LHLPLP antihypertensive peptide. Low-molecular-mass fractions from the heated, centrifuged, and filtered BSM-derived hydrolysates

generated by digestion of BSM with purified GeIE were recovered by centrifugal filtration ($4,000 \times g$) through 3 kDa cut-off membrane filters (Amicon ultra-4, Millipore). Polyclonal antibodies with predetermined specificity for peptide LHLPLP derived from bovine β -casein [f(133-138)] and a competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (CI-ELISA) were used to detect and quantify the peptide LHLPLP in the <3 kDa hydrolysates, as previously described (Gútiérrez et al., manuscript c under review). Briefly, wells of flat-bottom polystyrene microtiter plates (Maxisorp, Nunc, Roskilde, Denmark) were coated overnight (4°C) with $100\ \mu\text{l}$ of purified bovine β -casein (Sigma) at $2\ \mu\text{g/ml}$ in $0.1\ \text{M}$ sodium carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6 (coating buffer) and then washed three times with a washing solution (0.05% Tween 20 in $0.01\ \text{M}$ phosphate-buffered saline, pH 7.4, PBS). Wells were blocked at 37°C for 1 h with $300\ \mu\text{l}$ of 1% (w/v) ovalbumin (OA) grade III (Sigma) in PBS and then washed six times. Next, $50\ \mu\text{l}$ of the <3 kDa hydrolysates were added to the plates and simultaneously incubated with $50\ \mu\text{l}$ of the anti-LHLPLP antiserum (diluted 1:100 in PBS) at 37°C for 1 h. After the washing step, $100\ \mu\text{l}$ of the goat anti-rabbit IgG peroxidase conjugate (Cappel Laboratories, West Chester, PA, USA) diluted 1:500 in OA-PBS were added, and the plates incubated at 37°C for 30 min and further washed eight times. The amount of bound peroxidase was determined with ABTS (2,2'-azino-bis[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid]) (Sigma) as the substrate by measuring the absorbance of the wells at 405 nm with a Labsystems iEMS reader (Labsystems, Helsinki, Finland), equipped with a built-in software package for data analysis (Genesis version 1.60). Competition curves were obtained by plotting absorbance against the logarithm of the concentration of the <3 kDa hydrolysates and the synthetic LHLPLP, obtained by conventional Fmoc (fluorenyl-methoxycarbonyl) solid-phase synthesis (Applied Biosystems Inc., Überlingen, Germany), used in the CI-ELISA.

7.3. RESULTS

7.3.1. Growth and proteolytic activity of *E. faecalis* DBH18 and *Lb. casei* CECT475 (pCG).

The growth and determination of the proteolytic activity of *E. faecalis* DBH18 and *Lb. casei* CECT475 (pCG), grown in MRS, GM17 and TH, indicated that these were influenced by the strain, media and time of growth (results not shown), and that the optimum conditions for growth and proteolytic activity were obtained after 8 h growth of *E. faecalis* DBH18 and *Lb. casei* CECT475 (pCG) in GM17 and MRS, respectively (Fig. 7.1).

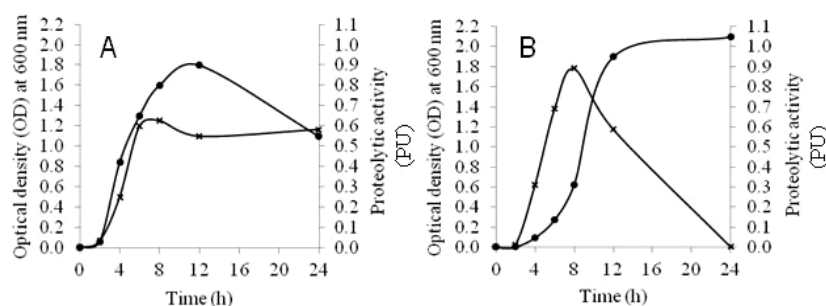


Fig. 7.1. Growth of *E. faecalis* DBH18 in GM17 (A) and *Lb. casei* CECT475 (pCG) in MRS (B), as measured by the optical density (OD) of the samples at 600 nm (●). The proteolytic activity of the cell-free supernatants was determined by the Hide Powder Azure (HPA) method (×). Data are mean from two independent determinations by duplicate.

7.3.2. Purification of GelE and MALDI-TOF/MS analysis. The growth of *E. faecalis* DBH18 and *Lb. casei* CECT475 (pCG) in GM17 and MRS, respectively, permitted purification of the produced GelE by precipitation of the proteins in the cell-free supernatants with ammonium sulfate, submission to hydrophobic interaction chromatography (HIC), and dialysis and concentration of the eluted fractions from the HIC step with the highest proteolytic activity. However, during purification of the GelE produced by *E. faecalis* DBH18 the caseinolytic activity of the purified fractions in the BSMA plates increased during the purification steps, while the caseinolytic activity of the purified fractions from *Lb. casei* CECT475 (pCG) decreased during the hydrophobic interaction step (**Fig. 7.2**).

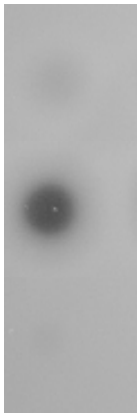
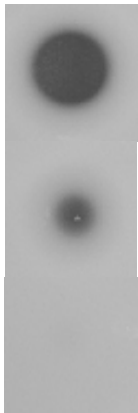

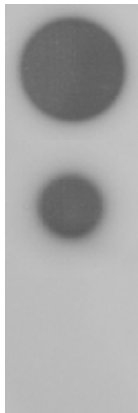

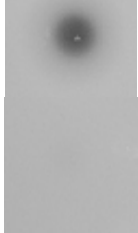
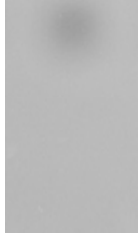
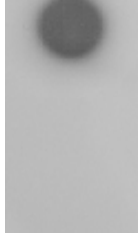
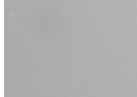
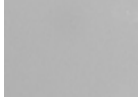
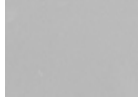
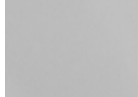
Strain	Cell-free culture supernatant	Ammonium Sulfate precipitation	Hydrophobic interaction chromatography	Dialysis and concentration
<i>E. faecalis</i> DBH18				
<i>Lb. casei</i> CECT475 (pCG)				
<i>Lb. casei</i> CECT475 (pMG36c)				

Fig. 7.2. Caseinolytic activity in bovine skim milk agar (BSMA) plates of fractions resulting from the purification of GelE from *E. faecalis* DBH18 and *Lb. casei* CECT475 (pCG). The *Lb. casei* CECT475 (pMG36c) culture was used as the non-producer GelE control strain.

Similarly, purification of the GelE from *E. faecalis* DBH18 permitted a 873-fold increase of its specific activity and a 2.6% recovery of its initial proteolytic activity while purification of the GelE from *Lb. casei* CECT475 (pCG) permitted a 31-fold increase of its specific activity and a 0.3% recovery of its initial proteolytic activity (**Table 7.1**).

Table 7.1. Purification of the GelE produced by *E. faecalis* DBH18 and *Lb. casei* CECT475 (pCG).

Strain	Purification step	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Specific proteolytic activity ^a	Increase in specific proteolytic activity ^b	Yield (%)
<i>E. faecalis</i> DBH18	Cell-free culture supernatant	1,000	3.3	0.6	1	100
	Ammonium sulphate precipitation	100	0.9	3.0	5.0	13.6
	Hydrophobic interaction chromatography, dialysis and concentration	0.5	0.2	524.3	873.8	2.6
<i>Lb. casei</i> CECT475 (pCG)	Culture supernatant	1,000	4.1	0.8	1	100
	Ammonium sulphate precipitation	100	0.6	87.7	109.6	160
	Hydrophobic interaction chromatography, dialysis and concentration	0.5	0.8	25.3	31.6	0.3

^a Proteolytic activity divided by the amount of protein and expressed in PU/mg.

^b Proteolytic activity of the fraction divided by that of the cell-free culture supernatant and expressed as fold change.

When the dialyzed and concentrated GelE purified from *E. faecalis* DBH18 and *Lb. casei* CECT475 (pCG) were subjected to SDS-PAGE (**Fig. 7.3**), several protein bands could be observed. However, when defined protein bands as indicated by an asterisk in **Fig. 7.3**, were submitted to in-gel trypsin digestion and MALDI-TOF/MS analysis the results obtained determined that major tryptic peptide fragments from each of the individual protein bands evaluated matched those encrypted in the amino acid sequence of the GelE synthesized by *E. faecalis* DBH18. These major peptide fragments covered 203 of the 318 amino acids of mature GelE for a sequence coverage of 63.8% (**Fig. 7.4**). Moreover, none of the assigned peptides matched the signal peptide sequence or prosequence of GelE suggesting that the enzyme is being correctly expressed, processed and extracellularly released by *E. faecalis* DBH18 and *Lb. casei* CECT475 (pCG). On the other hand, two of the identified peptides NSFQVT ([200-205]) and FNSAGIGAK ([485-493]), showed cleavage sites involving an hydrophobic amino acid (F) which matched the proteolytic activity of the GelE itself with the result of autolytic activity (Mäkinen et al., 1989). Unassigned peptide fragments were recognized as keratin-related peptides, a frequently observed contamination in MALDI-TOF/MS analysis.

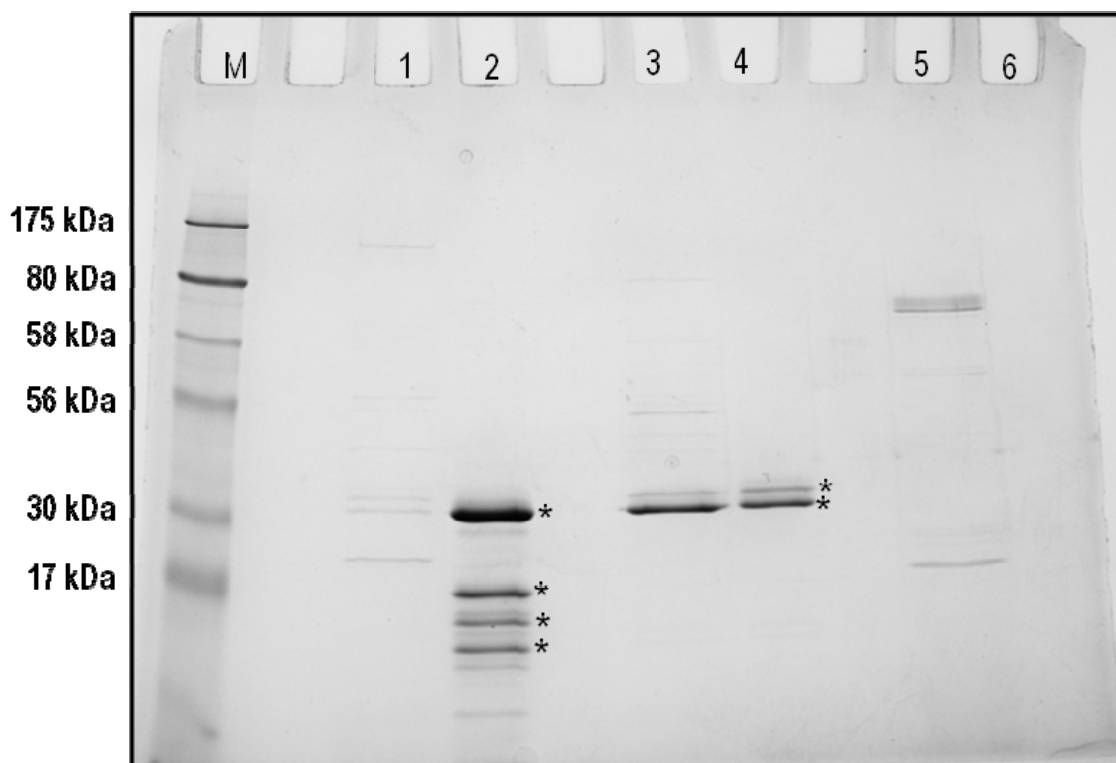


Fig. 7.3. Coomassie blue-stained SDS/PAGE gel showing protein bands from purified fractions resulting from purification of the GelE from *E. faecalis* DBH18 (lanes 1 and 2) and *Lb. casei* CECT475 (pCG) (lanes 3 and 4). *Lb. casei* CECT475 (pMG36c) was used as the non-producer GelE control strain (lanes 5 and 6). Samples in lanes 1, 3 and 5 correspond to the ammonium sulfate precipitation fractions (5 μ l), and samples in lanes 2, 4 and 5 correspond to the dialyzed and concentrated fractions from the hydrophobic interaction chromatography eluates with high proteolytic activity (5 μ l). With asterisk (*), protein bands submitted to MALDI-TOF/MS analysis. M, molecular weight marker with sizes (in kDa) given in the left margin.

MKGNKILYIL <i>GTGIFVGSSC LFSSLFVAAE</i> <i>EQVYSESEVS TVLSKLEKEV</i>	50
<i>ISEAAAEQYT VVDRKEDAWG MKHLKLEKQT EGVTVDSNDV I IHLNKNNGAV</i>	100
<i>TSVTGNPVDQ VVKIQSVDAI GEEGVKKIIA SDNPENKDLV FLAIDKRVNN</i>	150
<i>EGQLFYKVRV TSSPTGDPVS LVIKVNATDG TIMEKQDLTE HVGSEVTLKN</i>	200
<i>SFQVTFNVPV EKSNTGIALH GTDNTGVYHA VVDGKNNYSI IQAPSLATLN</i>	250
<i>QNAVDAYTHG KFKVTTYEDH FQRHSIDDRG MPILSVVDEQ HPDAYDNAFW</i>	300
<i>DGKAMRYGET STPTGKTYAS SLDVVGHEMT HGVTEHTAGL EYLGQSGALH</i>	350
<i>ESYSDLMGYI ISGASNPEIG ADTQSVDRKT GIRNLQTPSK HGQPETMAQY</i>	400
<i>DDRARYKGTP YYDQGGVHYN SGIINRIGYT IIQNLGIEKA QTIFYSSLVN</i>	450
<i>YLTPKAQFSD ARDAMLAAAK VQYGDEAASV VSAAFNSAGI GAKEDIQVNQ</i>	500
<i>PSESVLVNE</i>	509

Fig. 7.4. Location of major peptide fragments (double-ended arrows) identified by MALDI-TOF/MS after in-gel tryptic digestion of the dialyzed and concentrated samples of the GelE purified from *E. faecalis* DBH18 and *Lb. casei* CECT475 (pCG). Discontinuous double-ended arrows may correspond to peptides resulting from the autocatalytic activity of the purified GelE. All identified peptides corresponded to mature GelE. The N-terminal signal peptide of the GelE is in bold and its prosequence in italics.

7.3.3. ACE-inhibitory activity of the bovine skim milk (BSM)-derived hydrolysates. When freshly made reconstituted BSM was fermented with *E. faecalis* DBH18, *Lb. casei* CECT475 (pCG) or *Lb. casei* CECT475 (pMG36c) or digested with the GelE of their cell-free supernatants, ammonium sulfate precipitation fractions and the dialyzed and concentrated samples from the hydrophobic interaction chromatography (HIC) step, all samples showed a high ACE-IA except in samples with BSM fermented with *Lb. casei* CECT475 (pMG36c) or their corresponding purified fractions (**Table 7.2**). The BSM-derived hydrolysates displayed an ACE-IA with IC_{50} values from 6.5 to 73.6 μ g protein/ml. The lower IC_{50} value and, accordingly, the higher ACE-IA corresponded to BSM digested for 2 h with the purified GelE from *E. faecalis* DBH18. Slightly higher IC_{50} values were detected after short digestions (4 to 6 h) of BSM with the purified GelE from *E. faecalis* DBH18 or *Lb. casei* CECT475 (pCG). A high ACE-IA was observed in the BSM-derived hydrolysates produced after growth of *E. faecalis* DBH18 or *Lb. casei* CECT475 (pCG) during 24 or 48 h, respectively, in BSM. The presence of active GelE in the cell-free supernatants of *E. faecalis* DBH18 and *Lb. casei* CECT475 (pCG) is supported by the high ACE-IA of their BSM-derived hydrolysates, although these showed higher IC_{50} values and, accordingly, lower ACE-IA than those derived from digestion of BSM with the purified GelE of the rest of the purified fractions (**Table 7.2**).

Table 7.2. ACE-inhibitory activity (ACE-IA)^a of bovine skim milk (BSM) fermented with *E. faecalis* DBH18, *Lb. casei* CECT475 (pCG) and *Lb. casei* CECT475 (pMG36c) or incubated with fractions derived from the purification of GelE.

Fraction	Time (h) ^b	Source of GelE		
		<i>E. faecalis</i> DBH18	<i>Lb. casei</i> CECT475 (pCG)	<i>Lb. casei</i> CECT475 (pMG36c) ^c
Fermentation	0	NA	NA	NA
	12	32.1±3.1	29.6±2.4	NA
	24	7.1±0.9	23.3±2.6	NA
	48	9.6±1.1	8.5±0.8	NA
Cell-free culture supernatant	0	NA	NA	NA
	12	73.6±5.2	21.7±2.3	NA
	24	45.7±3.8	20.2±1.8	NA
	48	38.7±3.5	17.0±2.1	NA
Ammonium sulfate precipitation	0	NA	NA	NA
	6	41.6±4.5	10.6±1.1	NA
	12	19.4±1.6	12.2±0.8	NA
	24	17.0±0.9	22.8±2.6	NA
Hydrophobic interaction chromatography, dialysis and concentration	0	NA	NA	NA
	2	6.5±0.4	33.8±3.1	NA
	4	8.2±0.7	26.9±2.2	NA
	6	7.9±0.9	20.3±1.7	NA
	24	12.1±1.1	10.3±0.8	NA

^a ACE-inhibitory activity (ACE-IA) expressed as IC₅₀ (µg protein/ml). Data are mean from three independent determinations in triplicate.

^b Time of incubation.

^c The *Lb. casei* CECT475 (pMG36c) culture was used as the non-producer GelE control strain.

NA: No Activity.

7.3.4. Peptide profiles and identification of major peptide fragments in the BSM-derived hydrolysates. When hydrolysates from BSM fermented with *E. faecalis* DBH18, *Lb. casei* CECT475 (pCG) or *Lb. casei* CECT475 (pMG36c), and hydrolysates from BSM digested with purified fractions from those bacterial producers were subjected to MALDI-TOF/MS analysis, the major peptide profiles in the hydrolysates varied slightly among the samples although despite their apparent heterogeneity, peptide fragments with identical monoisotopic mass were observed in all the hydrolysates (results not shown). In this context, the peptide profile of the BSM-derived hydrolysate after growth of *E. faecalis* DBH18 during 48 h in BSM was almost identical to that of the BSM digested with the purified GelE from *E. faecalis* DBH18 for 2 h (results not shown). Furthermore, MALDI-TOF/MS analysis of the BSM-derived hydrolysates from fermented or digested samples with high ACE-IA allowed the identification of 15 major peptide fragments, 13 of which corresponded to bovine β -casein fragments and 2 to α_{s1} -casein fragments, including peptides with previously reported ACE-IA and antihypertensive activity (**Table 7.3**).

Table 7.3. Major peptide fragments in bovine skim milk (BSM)-derived hydrolysates with angiotensin-converting enzyme-inhibitory activity (ACE-IA).

Observed mass	Calculated mass ^a	Protein fragment	Peptide sequence	Previously described ACE-inhibitory peptides (ACE-IP) ^b	BSM-derived hydrolysates ^c
656.5	656.397	β -CN f(82-87)	VVPPF	VVPPF	1,3,5,6
671.3	671.383	β -CN f(201-206)	VRGPPF	VRGPPF	1,2,3,4,5,6
674.3	674.331	β -CN f(1-5)	RELEE	-----	3,4
680.3	680.320	β -CN f(52-57)	FAQTQS	-----	5
688.4	688.434	β -CN f(133-138)	LHLPLP	LHLPLP	1,2,3,4,5,6
742.3	742.350	β -CN f(181-186)	PQRDMP	-----	3,5
759.3	759.456	β -CN f(95-101)	VSKVKET	VSKVKET	6
801.6	801.519	β -CN f(133-139)	LHLPLP	LHLPLP	1,2,3,4,5,6
997.0	996.619	β -CN f(201-209)	VRGPPPIV	VRGPPPIV	1,2,3,4,5,6
1,037.4	1,037.609	β -CN f(197-206)	VLGPVRGPPF	VRGPPF	1,4,5,6
1,172.5	1,172.572	β -CN f(177-186)	AVPYPQRDMP	-----	1,3,4,5,6
1,362.2	1,362.336	β -CN f(197-209)	VLGPVRGPPPIV	VRGPPPIV	1,4,5,6
1,485.6	1,486.163	β -CN f(12-22)	IVESLSSEES	-----	1,3,4,5,6
633.4	633.378	α _{S1} -CN f(1-5)	RPKHP	-----	3,6
873.4	873.462	α _{S1} -CN f(149-154)	LFRQFY	-----	4

^a Monoisotopic mass.

^b Previously described ACE-inhibitory peptides (ACE-IP) with ACE-IA or sharing, at least, three C-terminal residues with those found in this study.

^c BSMBSM-derived hydrolysates: 1. *E. faecalis* DBH18, grown in BSM; 2. *E. faecalis* DBH18 grown in GM17, ammonium sulfate precipitation fraction; 3. *E. faecalis* DBH18 grown in GM17, fraction after hydrophobic interaction chromatography, dialysis and concentration; 4. *Lb. casei* CECT475 (pCG), grown in BSM; 5. *Lb. casei* CECT475 (pCG) grown in MRS, ammonium sulfate precipitation fraction; 6. *Lb. casei* CECT475 (pCG) grown in MRS, fraction after hydrophobic interaction chromatography, dialysis and concentration.

7.3.5. Detection and quantification of the antihypertensive peptide LHLPLP. The use of specific polyclonal antibodies of predetermined specificity for peptide LHLPLP and a CI-ELISA has permitted to determine the amount of LHLPLP in the BSM-derived hydrolysates from the purified GelE from *E. faecalis* DBH18 and *Lb. casei* CECT474 (pCG), as well as to determine the correlation between their ACE-IA and the amount of LHLPLP in these hydrolysates (Table 7.4).

Table 7.4. ACE-inhibitory activity (ACE-IA)^a and amount of peptide LHLPLP^b in bovine skim milk (BSM) incubated with GelE purified from *E. faecalis* DBH18 and *Lb. casei* CECT475 (pCG).

Source of GelE	Time (h) ^c	IC ₅₀ (µg protein/ml)	LHLPLP (µg/ml)
<i>E. faecalis</i> DBH18	0	NA	ND
	2	6.2	430
	4	8.6	610
	6	7.6	660
	24	12.5	720
<i>Lb. casei</i> CECT475 (pCGSP)	0	NA	ND
	2	32.0	320
	4	26.2	360
	6	21.5	530
	24	10.5	540

^a ACE-inhibitory activity (ACE-IA) expressed as IC₅₀ (µg protein/ml). Data are mean from two independent determinations in triplicate.

^b Amount of LHLPLP calculated by using a CI-ELISA with polyclonal antibodies specific for LHLPLP.

^c Time of incubation.

NA: No activity.

ND: Not detected.

7.4. DISCUSSION

The GelE is a metalloendoprotease produced by *E. faecalis* known to contribute to biofilm formation, evasion of the immune system and virulence through degradation of a range of host proteinaceous substrates (Waters et al., 2003; Park et al., 2007, Park et al., 2008; Steck et al., 2011). However, it has been also reported that GelE may also play a role, not associated to virulence, in the biology of *E. faecalis* (Teixeira et al., 2012). Moreover, most but not all, *E. faecalis* strains of food, environmental and clinical origin produce BSM-derived hydrolysates with ACE-IA due to the production of ACE-IP (Gútiérrez et al., manuscript a under review) while the expression of GelE by recombinant *Enterococcus* spp. and *Lb. casei* CECT475 strains permit the release of ACE-IP and other bioactive peptides during their growth in BSM (Gútiérrez et al., manuscript b under review). However, the synthesis of potential virulence factors by the GelE-producing *E. faecalis* and other *Enterococcus* spp. strains drive the exploration of safer recombinant bacterial and yeast systems for the biotechnological production of GelE (Gútiérrez et al., manuscript c under review). Another approach for production of bioactive peptides, including peptides with proven antihypertensive activity from proteinaceous substrates would be through the enzymatic hydrolysis of these substrates by the protease GelE, partially purified or purified to homogeneity.

In this work, three growth media namely MRS, GM17 and TH were evaluated for optimized microbial growth and proteolytic activity by *E. faecalis* DBH18, a natural GelE-producer strain (Sánchez et al., 2007) and by *Lb. casei* CECT475 (pCG), a recombinant strain where the P₃₂ constitutive promoter in plasmid pCG (Gútiérrez et al., manuscript b under review) drives the constitutive transcription of the cloned *gelE*. Differences in proteolytic activity for cultures grown in different media (results not shown) suggest that nitrogen sources such as yeast extract, peptone and tryptone may modulate protein synthesis as observed during evaluation of the proteolytic activity of cell envelope associated proteinases (CEP) of some lactobacilli or reflect metabolic differences among the GelE producing strains (Hebert et al., 2002; Hebert et al., 2008). Several studies have shown that the proteolytic activity of bacteria grown in a peptide-rich medium such as MRS is reduced compared to those grown in a synthetic medium (Hebert et al., 2008; Sadat-Mekmene et al., 2011). The results of this work show that the best growth and the highest proteolytic activity was obtained by *E. faecalis* DBH18, grown in GM17 and by *Lb. casei* CECT475 (pCG), grown in MRS, during 8 h at 37 °C (**Fig. 7.1**).

The GelE from cell-free culture supernatants of *E. faecalis* DBH18 and *Lb. casei* CECT475 (pCG) after growth in either GM17 or MRS, respectively, was purified by ammonium sulfate precipitation (ASP), hydrophobic interaction chromatography (HIC) and further dialysis and concentration of the HIC eluates with the highest proteolytic activity. However, differences in the caseinolytic (**Fig. 7.2**) and proteolytic activity (**Table 7.1**) of the purified fractions were observed in the GelE purified from *E. faecalis* DBH18 and *Lb. casei* CECT475 (pCG) with an increase of their specific proteolytic activity of 873- and 31-fold, respectively and a recovery of its initial proteolytic activity of 2.6- and 0.3%, respectively (**Table 7.1**). It seems that unknown components in the GM17 medium interfere with the proteolytic activity of the GelE produced by *E. faecalis* DBH18 during the ASP step, while other compounds interfere with the elution and/or the proteolytic activity of the GelE produced by *Lb. casei* CECT475 (pCG) during the HIC step. Furthermore, analysis by SDS-PAGE of the GelE purified from *E. faecalis* DBH18 and *Lb. casei* CECT475 (pCG) permitted visualization (**Fig. 7.3**) of protein bands of similar molecular weight to that of mature GelE or to mature GelE without its C-terminal processing (Del Papa et al., 2007). On the other hand, the MALDI-TOF/MS analysis of the in-gel trypsin digested bands of purified GelE from *E. faecalis* DBH18 or *Lb. casei* CECT475 (pCG) permitted the identification of major peptide fragments encrypted into mature GelE. Moreover, since none of the identified peptides matched the signal peptide sequence or the prosequence of GelE the results obtained confirm that mature GelE is correctly processed and extracellularly released by the natural *E. faecalis* DBH18 and the recombinant *Lb. casei* CECT475 (pCG) GelE-producer strains. However, different conformational structures and other still unknown molecular events would explain the different proteolytic activity of purified GelE from both bacterial producers. Nevertheless, with the purification scheme used in this work, *E. faecalis* DBH18 grown in GM17 seems to be an efficient source for purification of the GelE but, further efforts would be performed for purification to homogeneity of the GelE produced by other microbial producers growing in different media and with higher proteolytic specific activity and yield.

The fermentation of BSM with *E. faecalis* DBH18 or *Lb. casei* CECT475 (pCG) and the enzymatic hydrolysis of BSM with purified GelE fractions from these bacterial GelE-producers, originated BSM-derived hydrolysates of high ACE-IA (**Table 7.2**). The ACE-IA of the hydrolysates was high with IC₅₀ values within the range previously reported for peptide fragments of high ACE-IA (Gobbetti et al., 2000; Gomez-Ruiz et al., 2002; Muguerza et al., 2006; Miguel et al., 2009). The purified GelE showed much

lower incubation times than microbial cultures for production of BSM-derived hydrolysates of high ACE-IA. Furthermore, the BSM-derived hydrolysates from purified GelE showed a higher ACE-IA than milk-derived hydrolysates produced by digestive enzymes (Contreras et al., 2009), confirming the efficiency of proteases of bacterial origin in the release of milk-derived ACE-IP (Hernández-Ledesma et al., 2002; Otte et al., 2007). Moreover, the purified GelE from *E. faecalis* DBH18 and *Lb. casei* CECT475 (pCG) produced milk-derived hydrolysates of similar or higher ACE-IA than other purified proteinases from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Guo et al., 2009), *Lactobacillus helveticus* PR4 (Minervini et al., 2003), *Aspergillus oryzae* (Tsai et al., 2008) or *Bacillus thermoproteolyticus* (Mäkinen et al., 1989; Hernández-Ledesma et al., 2002; Otte et al., 2007).

The MALDI-TOF/MS analysis of the BSM fermented with *E. faecalis* DBH18 or *Lb. casei* CECT475 (pCG) and of the BSM digested with purified fractions of the GelE produced by these bacterial producers, permitted identification of their major peptide fragments. Some of the identified peptides such as VVPPF [f(82-87)], VSKVKET [f(95-101)], LHLPLP [f(133-138)], LHLPLPL [f(133-139)], VLGPVRGPF [f(197-206)], VLGPVRGPFPIIV [f(197-209)], VRGPF [f(201-206)] and VRGPFPIIV [f(201-209)] (**Table 7.3**) have been reported to exhibit a high ACE-IA or share, at least, three C-terminal residues with those with ACE-IA (Gómez-Ruiz et al., 2002; Miguel et al., 2006; Quirós et al., 2007). Furthermore, the peptides VRGPF, LHLPLP, LHLPLPL and VLGPVRGPFPIIV were identified in all the BSM-derived hydrolysates with high ACE-IA. The caseins were cleaved at peptide bonds with hydrophobic residues such as leucine (L), isoleucine (I), phenylalanine (F) or valine (V), which matches GelE activity and specificity (Mäkinen et al., 1989).

The detection and quantification of peptide LHLPLP was also determined in the <3 kDa hydrolysates of BSM digested with purified GelE from *E. faecalis* DBH18 and *Lb. casei* CECT475 (pCG) (**Table 7.4**) by using a CI-ELISA as a sensitive, rapid and cheaper alternative to other analytical techniques including RP-HPLC-MS/MS (Quirós et al., 2006; Gútiérrez et al., manuscript c under review). The peptide LHLPLP is a true competitive inhibitor of ACE, is resistant to gastrointestinal proteases, and shows *in vivo* antihypertensive activity in spontaneously hypertensive rats (SHR) (Miguel et al., 2006; Quirós et al., 2007; Quirós et al., 2009). The peptide LHLPLP was detected in larger amounts in the BSM digested with purified GelE from *E. faecalis* DBH18 (**Table 7.4**). Comparison among the ACE-IA and the amount of peptide LHLPLP in the evaluated samples revealed that although increasing amounts of LHLPLP were, in general, accompanied by an increase in the ACE-IA of the samples, there was not found a simple linear relationship between these parameters (results not shown). Fluctuations in the ACE-IA of the filtered hydrolysates may be due to loss of higher molecular mass peptides with synergic ACE-IA. Other studies trying to correlate the ACE-IA of hydrolysates to total peptides in the hydrolysates have not either found a linear relationship among them (Fuglsang et al., 2003; Hernández-Ledesma et al., 2004; Robert et al., 2004; Pripp et al., 2006; Quirós et al., 2006; Nielsen et al., 2009). Further experiences would permit further purification of peptide LHLPLP from the BSM-derived hydrolysates and exploit the potential of the CI-ELISA to identify those fractions with the largest amounts of this antihypertensive peptide.

Due to the increasing interest in the development of dairy products with beneficial biological properties the results of this work suggest that the hydrolysis of BSM, either by fermentation with *E. faecalis* DBH18 or *Lb. casei* CECT475 (pCG) or by digestion with purified GelE from these bacterial producers, releases ACE-IP with previously demonstrated ACE-IA and antihypertensive activity. The

recombinant *Lb. casei* CECT475 (pCG) may produce safer BSM-derived hydrolysates than those produced by *E. faecalis* encoding potential virulence factors. On the other hand, BSM digested with purified GelE from *E. faecalis* DBH18 produced hydrolysates of higher ACE-IA and larger production of the antihypertensive peptide LHLPLP than BSM digested with the purified GelE from *Lb. casei* CECT475 (pCG). The ability of purified GelE to release peptides with ACE-IA and antihypertensive activity from BSM has been shown here for the first time. However, further studies should evaluate more efficient procedures for purification of the GelE produced by other natural or recombinant microbial producers as well as to identify novel peptides with antimicrobial, antioxidant, immunomodulatory and other biological activities after digestion of many other food-derived proteins with purified GelE.

7.5. ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge to Dr. Morten Skaugen from the Proteomics Core Facility of the Norwegian University of Life Sciences (UMB), Ås (Norway) for his help with the MALDI-TOF/MS equipment and data analysis. This work was partially supported by projects AGL2012-34829 from the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) and AGL2009-08348 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN), by a CENIT project (2006-2009) from the MITC-CDTI, by grant GR35-10A from the BSCH-UCM, and by grant S2009/AGR-1489 from the Comunidad de Madrid (CAM). L. Gútiez holds a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC), and J. J. Jiménez and S. Arbulu are recipient of fellowships from the MICINN, Spain.

7.6. REFERENCES

- Contreras, M. M., Carrón, R., Montero, M. J., Ramos, M., and Recio, I. (2009). Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *Int. Dairy J.* 19:566-573.
- Del Papa, M. F., Hancock, L. E., Thomas, V. C., and Perego, M. (2007). Full activation of *Enterococcus faecalis* gelatinase by a C-terminal proteolytic cleavage. *J. Bacteriol.* 189:8835-8843.
- Fuglsang, A., Rattray, F., Nilsson, D., and Nyborg, N. C. B. (2003). Lactic acid bacteria: inhibition of angiotensin converting enzyme in vitro and in vivo. *Antonie Leeuwenhoek* 83:27-34.
- Gobbetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffredi, F., and Addeo, F. (2000). Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3898-3904.
- Gobbetti, M., Minervini, F., and Rizzello, C. G. (2004). Angiotensin-I-converting enzyme-inhibitory and microbial-bioactive peptides. *Int. J. Dairy Technol.* 57:173-187.
- Gómez-Ruiz, J. A., Ramos, M., and Recio, I. (2002). Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *Int. Dairy J.* 12:697-706.
- Guo, Y., Pan, D., Zeng, X., and Tanokura, M. (2009). Purification and characterization of CEP from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. *Food Chem.* 112:533-538.
- Gútiez, L., Gómez-Sala, B., Recio, I., del Campo, R., Cintas, L. M., Herranz, C., and Hernández, P. E. *Enterococcus faecalis* strains from food, environmental, and clinical origin produce ACE-inhibitory peptides and other bioactive peptides during growth in bovine skim milk, (Manuscript a under review).
- Gútiez, L., Borrero, J., Jiménez, J. J., Gómez-Sala, B., Recio, I., Cintas, L. M., Herranz, C., and Hernández, P. E. Genetic and biochemical evidence that gelatinase (GelE) encoded by

- Enterococcus faecalis* DBH18 produce bovine milk-derived hydrolysates with ACE-inhibitory activity, (Manuscript b under review).
- Gútiérrez, L., Otte, J. A. H., Vogensen, F. K., Borrero, J., Arbulu, S., Cintas, L. M., Herranz, C., and Hernández, P. E. Heterologous expression of enterococcal proteases by lactic acid bacteria (LAB) and yeasts: *Lactobacillus casei* CECT475, expressing the gelatinase (GelE) from *Enterococcus faecalis* DBH18, releases ACE-inhibitory peptides (ACE-IP) during growth in bovine milk, (Manuscript c under review).
- Hayes, M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., and Ross, R. P. (2007). Putting microbes to work: dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: bioactive peptide functions. *Biotechnol. J.* 2:435-449.
- Hebert, E. M., Raya, R. R., and de Giori, G. S. (2002). Modulation of the cell-surface proteinase activity of the thermophilic lactobacilli by the peptide supply. *Curr. Microbiol.* 49:385-389.
- Hebert, E. M., Mamone, G., Picariello, G., Raya, R. R., Savoy, G., Ferranti, P., and Addeo, F. (2008). Characterization of the pattern of α_{S1} - and β -casein breakdown and release of a bioactive peptide by a cell envelope proteinase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:3682-3689.
- Hernández-Ledesma, B., Recio, I., Ramos, M., and Amigo, L. (2002). Preparation of ovine and caprine β -lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine β -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. *Int. Dairy J.* 12:805-812.
- Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M., and Recio, I. (2004). Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products. Formation of peptides under simulated gastrointestinal digestion. *J. Agric. Food Chem.* 52:1504-1510.
- Lammlí, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lopez-Fandiño, R., Otte, J., and van Camp, J. (2006). Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *Int. Dairy J.* 16:1227-1293.
- Mäkinen, P. L., Clewell, D. B., An, F., and Mäkinen, K. K. (1989). Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metalloendopeptidase ("gelatinase") from *Streptococcus faecalis* (OG1-10). *J. Biol. Chem.* 264:3325-3334.
- Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., Recio, I., and Hernández-Ledesma, B. (2012). Antihypertensive peptides from proteins: a review. *Food Funct.* 3:350-361.
- Miguel, M., Recio, I., Ramos, M., Delgado, M. A., and Aleixandre, M. A. (2006). Antihypertensive effect of peptides obtained from *Enterococcus faecalis*-fermented milk in rats. *J. Dairy Sci.* 89:3352-3359.
- Miguel, M., Contreras, M. M., Recio, I., and Aleixandre, A. (2009). ACE-inhibitory and antihypertensive properties of a bovine casein hydrolysate. *Food Chem.* 112:211-214.
- Minervini, F., Algaron, F., Rizzello, C. G., Fox, P. F., Monnet, V., and Gobbetti, M. (2003). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. *App. Environ. Microbiol.* 69:5297-5305.
- Muguerza, B., Ramos, M., Sánchez, E., Manso, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A., Delgado, M. A., and Recio, I. (2006). Antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk. *Int. Dairy J.* 16:61-69.
- Murray, B. A., and Fitzgerald, R. J. (2007). Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: biochemistry, bioactivity and production. *Curr. Pharm. Des.* 13:773-791.

- Nielsen, M. S., Martinussen, T., Flambard, B., Sørensen, K. I., and Otte, J. (2009). Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: Effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. *Int. Dairy J.* 19:155-165.
- Otte, J., Shalaby, S. M., Zakora, M., Pripp, A. H., and El-Shabrawy, S. A. (2007). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk protein hydrolysates: Effect of substrate, enzyme and time of hydrolysis. *Int. Dairy J.* 17:488-503.
- Park, S. Y., Kim, K. M., Lee, J. H., Seo, S. J., and Lee, I. H. (2007). Extracellular gelatinase of *Enterococcus faecalis* destroys a defence system in insect hemolymph and human serum. *Infect. Immun.* 75:1861-1869.
- Park, S. Y., Shin, Y. P., Kim, C. H., Park, H. J., Seong, Y. S., Kim, B. S., Seo, S. J., and Lee, I. H. (2008). Immune evasion of *Enterococcus faecalis* by an extracellular gelatinase that cleaves C3 and iC3b. *J. Immunol.* 181:6328-6336.
- Pripp, A. H., Sørensen, R., Stepaniak, L., and Sørhaug, T. (2006). Relationship between proteolysis and angiotensin-I-converting enzyme inhibition in different cheeses. *Food Sci. Technol. Int.* 39:677-683.
- Qin, X., Singh, K.V., Weinstock, G.M., and Murray, B.E. 2000. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infect. Immun.* 68:2579-2586.
- Quirós, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A., and Recio, I. (2006). Determination of the antihypertensive peptide LHLPLP in fermented milk by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Dairy. Sci.* 89:4527-4535.
- Quirós, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A., and Recio, I. (2007). Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *Int. Dairy J.* 17:33-41.
- Quirós, A., Contreras, M. M., Ramos, M., Amigo, L., and Recio, I. (2009). Stability to gastrointestinal enzymes and structure-activity relationship of β -casein-peptides with antihypertensive properties. *Peptides* 30:1848-1853.
- Rappsilber, J., Ishihama, Y., and Mann, M. (2003). Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal. Chem.* 75: 663-670.
- Robert, M-C., Razamane, A., Mutter, M., and Juillerat, M. A. (2004). Identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from sodium caseinate hydrolysates produced by *Lactobacillus helveticus* NCC2765. *J. Agric. Food Chem.* 52: 6923-6931.
- Sadat-Mekmene, L., Jardin, J., Corre, C., Mollé, D., Richoux, R., Delage, M. M., Lortal, S., and Gagnaire, V. (2011). Simultaneous presence of PrtH and PrtH2 proteinases in *Lactobacillus helveticus* strains improves breakdown of the pure α_{s1} -casein. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:179-186.
- Sánchez, J., Basanta, A., Gómez-Sala, B., Herranz, C., Cintas, L. M., and Hernández, P. E. (2007). Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Int. J. Food Microbiol.* 117:295-305.
- Sentandreu, M. A., and Toldrá, F. (2006). A fluorescence-based protocol for quantifying angiotensin-converting enzyme activity. *Nat. Protoc.* 1:2423-2427.
- Seppo, L., Jauhiainen, T., Poussa, T., and Korpela, R. (2003). A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 77:326-330.

- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V., and Mann, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* 1: 2856-2860.
- Sifri, C. D., Mylonakis, E., Singh, K. V., Qin, X., Garsin, D. A., Murray, B. E., Ausubel, F. M., and Calderwood, S. B. (2002). Virulence effect of *Enterococcus faecalis* protease genes and the quorum-sensing locus *fsr* in *Caenorhabditis elegans* and mice. *Infect Immun.* 70:5647-5650.
- Steck, N., Hoffmann, M., Sava, I. G., Kim, S. C., Hahne, H., Tonkonogy, S. L., Mair, K., Krueger, D., Pruteanu, M., Shanahan, F., Vogelman, R., Schemann, M., Kuster, B., Sartor, R. B., and Haller, D. (2011). *Enterococcus faecalis* metalloprotease compromises epithelial barrier and contributes to intestinal inflammation. *Gastroenterology* 141:959-971.
- Su, Y. A., Suloavik, M. C., He, P., Mäkinen, K. K., Mäkinen, P. L., Fiedler, S., Wirth, R., and Clewell, D. B. (1991). Nucleotide sequence of the gelatinase gene (*gelE*) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. *Infect. Immun.* 59:415-420.
- Teixeira, N., Santos, S., Marujo, P., Yokohata, R., Iyer, V. S., Nakayama, J., Hancock, L. E., Serrão, P., and Silva Lopes, M. F. (2012). The incongruent gelatinase genotype and phenotype in *Enterococcus faecalis* are due to shutting off the ability to respond to the gelatinase biosynthesis-activating pheromone (GBAP) quorum-sensing signal. *Microbiology* 158:519-528.
- Tsai, J.-S., Chen, T.-J., Pan, B. S., Gong, S.-D., and Chung, M.-Y. (2008). Antihypertensive effect of bioactive peptides produced by protease facilitated lactic acid fermentation of milk. *Food Chem.* 106:552-558.
- Waters, C. M., Antiporta, M. H., Murray, B. E., and Dunne, G. M. (2003). Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. *J. Bacteriol.* 185:3613-3623.
- Yamamoto, N., Akino, A., and Takano, T. (1994). Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.* 77:917-922.

CAPÍTULO

8

Resultados y discusión general

Nota aclaratoria: a lo largo de este capítulo se muestran los resultados descritos en los capítulos 3, 4, 5, 6 Y 7 y las conclusiones derivadas de éstos. Para ello, se hará referencia a figuras y tablas de los capítulos citados, las cuales se reseñarán con el número del capítulo de dónde proceden, seguido de su número de identificación en el capítulo correspondiente.

8.1. PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS INHIBIDORES DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE LA ANGIOTENSINA (ECA) Y OTROS PÉPTIDOS BIOACTIVOS POR CEPAS DE *Enterococcus faecalis* DE ORIGEN ALIMENTARIO, AMBIENTAL Y CLÍNICO DURANTE SU DESARROLLO EN LECHE DESNATADA DE VACA

RESUMEN

En este trabajo ochenta y siete bacterias lácticas (BAL) de diversos orígenes se analizaron para determinar la actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) (AI-ECA) de los hidrolizados lácteos generados durante su desarrollo en leche desnatada de vaca (LDV). Sólo aquellos cultivos que originaron una hidrólisis intensa de la LDV mostraron una elevada AI-ECA de modo que la mayoría (87% activas) pero no todas (13% inactivas) las cepas de *E. faecalis* evaluadas se identificaron como las BAL con mayor AI-ECA. El análisis por RP-HPLC-MS/MS (del inglés, *Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*) de los hidrolizados lácteos de los cultivos de *E. faecalis* desarrollados en LDV y con una elevada AI-ECA permitió la identificación, entre los fragmentos peptídicos mayoritarios, de péptidos inhibidores de la ECA (PI-ECA) y de un péptido antioxidante. Por otra parte, en los hidrolizados lácteos evaluados también se observó actividad antimicrobiana frente a *Pedococcus damnosus* CECT4797 y *Listeria ivanovii* CECT913. A los enterococos se les atribuye un papel beneficioso en el desarrollo de las características sensoriales de los alimentos fermentados y algunos son permitidos para su uso como probióticos. Sin embargo, los enterococos son también colonizadores del tracto gastrointestinal de los mamíferos con estilos de vida que fluctúan de simbiosis intestinales a patógenos multirresistentes a antibióticos y responsables de infecciones nosocomiales. Por ello, en este estudio se consideró conveniente determinar la posible presencia de factores potenciales de virulencia en las cepas de *E. faecalis* con elevada AI-ECA y productoras de PI-ECAs y otros péptidos bioactivos. La incidencia de factores potenciales de virulencia en las cepas de *E. faecalis* evaluadas fue variable, aunque se observó un menor número de ellos en las de cepas origen alimentario y ambiental que en las cepas clínicas de referencia. Asimismo, para determinar la similitud e identidad genética de las cepas de *E. faecalis* con mayor AI-ECA se emplearon técnicas de electroforesis en campo pulsante (PFGE) y de MLST (del inglés, *Multilocus Sequence Typing*) lo que demostró que las cepas de *E. faecalis* de origen alimentario y ambiental eran genéticamente diferentes a las de origen clínico. Dado que la mayoría de las cepas clínicas de *E. faecalis* también produjeron durante su desarrollo en LDV hidrolizados lácteos con elevada AI-ECA y presencia de PI-ECAs, los resultados de este estudio sugieren que la mayoría pero no todas las cepas de *E. faecalis* de origen alimentario, ambiental y clínico producen péptidos bioactivos derivados de la LDV con efectos potencialmente beneficiosos para la salud y con posibles aplicaciones farmacéuticas, médicas y veterinarias.

8.1.1. Desarrollo de las bacterias lácticas (BAL) en leche desnatada de vaca (LDV), determinación de su actividad inhibidora de la ECA (AI-ECA) e identificación de los fragmentos peptídicos mayoritarios

Ochenta y siete BAL de origen alimentario (62,2%; de las que un 27,7% procedían de leche y productos lácteos, un 24,1% de pescado y derivados de pescado y un 6% de carne y derivados cárnicos), de origen ambiental (15,7%) o de origen desconocido o no descrito (24,1%) (**Tabla 3.1**), se desarrollaron en LDV. Sin embargo, tras el desarrollo de los cultivos en LDV se observaron las siguientes modificaciones del sustrato: (i) un hidrolizado intenso de la LDV (21,7%); (ii) un hidrolizado ligero (3,6%); (iii) la formación de una cuajada (20,5%); (iv) el espesamiento de la leche (14,5%); o (v) ninguna modificación visualmente apreciable (39,8%). Igualmente, de gran interés fue el reconocimiento de que solamente los cultivos de *E. faecalis* productores de hidrolizados lácteos intensos de la LDV (87% de las cepas de *E. faecalis* evaluadas) mostraron una elevada AI-ECA con valores de IC₅₀ (concentración de proteína para inhibir la actividad de la ECA en un 50%) muy bajos (<100 µg de proteína/ml) (**Tabla 3.2**). Los valores de IC₅₀ de los hidrolizados lácteos producidos por la mayoría de las cepas de *E. faecalis* evaluadas fueron de 16,1 a 28,4 µg de proteína/ml y comparables a la IC₅₀ (49,5 µg de péptido/ml o 100 µM) del compuesto sintético enalapril ((S)-N-(1[ethoxycarbonil]-3fenilpropil)-ala-pro-maleato) utilizado clínicamente como inhibidor de la ECA (Minervini y col., 2003) (**Tabla 3.2**). Sin embargo, dos de las cepas de *E. faecalis* evaluadas, *E. faecalis* CECT4039 y *E. faecalis* P77, produjeron un espesamiento y una cuajada, respectivamente, de la LDV sin una AI-ECA medible de sus sobrenadantes libres de células. Aunque ya se conocía que cepas de *E. faecalis* de origen lácteo producían hidrolizados de elevada AI-ECA tras su desarrollo en diversos sustratos lácteos (Muguerza y col., 2006; Regazzo y col., 2010; Chaves-López y col., 2011) los resultados de este trabajo sugieren por primera vez, a menos que desconozcamos la fuente, que la mayoría pero no todos los *E. faecalis* de origen alimentario y ambiental producen hidrolizados lácteos de elevada AI-ECA durante su desarrollo en LDV.

Asimismo, el análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con columnas cromatográficas de fase inversa (RP-HPLC) acoplada a espectrometría de masas en tándem con ionización de las muestras por electrospray (RP-HPLC-MS/MS) de los sobrenadantes libres de células de los cultivos de *E. faecalis* desarrollados en LDV y con una elevada AI-ECA, permitió la identificación de 27 fragmentos peptídicos mayoritarios derivados de la hidrólisis endógena de las caseínas bovinas. Algunos de los péptidos identificados como los péptidos LQDKIHP [*f*(47-51)], VSKVKET [*f*(95-101)], VVVPPF [*f*(99-103)], LHLPLP [*f*(133-138)], LHLPLPL [*f*(133-139)], VLGPVRGPFP [*f*(197-206)], VRGPFP [*f*(201-206)] y VRGPFPIIV [*f*(201-209)] proceden de la β-caseína (β-CN) bovina mientras otros como los péptidos LLRFP [*f*(20-23)] y LKKYKVPQ [*f*(101-108)] proceden de la α_{s1}-caseína (α_{s1}-CN) bovina (**Tabla 3.3**). De los péptidos mayoritarios identificados se conoce que la mayoría manifiestan AI-ECA o comparten, al menos, tres residuos aminoácidos de su región C-terminal con otros péptidos con AI-ECA (Gómez-Ruiz y col., 2002; Quirós y col., 2005; Contreras y col., 2009). Muchos de los PI-ECA identificados en los hidrolizados lácteos de las cepas de *E. faecalis* son ricos en el aminoácido prolina (P), uno de los aminoácidos que mejor favorecen la unión del péptido al centro activo de la ECA. Asimismo, el péptido LHLPLP identificado en los hidrolizados lácteos de todas las cepas de *E. faecalis* con

una elevada AI-ECA (**Fig. 8.1**), no solamente es un inhibidor potente de la ECA *in vitro* sino que, además, es resistente a la actividad de proteasas gastrointestinales con una potente actividad antihipertensiva *in vivo* en ratas espontáneamente hipertensas (SHR del inglés, *Spontaneously Hypertensive Rats*) (Miguel y col., 2006; Quirós y col., 2009). Por otra parte, el péptido antioxidante VLPVPQK [β -caseína, f(170-176)] (Rival y col., 2001) identificado por primera vez entre los péptidos mayoritarios derivados de la hidrólisis de la LDV por las cepas de *E. faecalis* evaluadas, se detectó en todos los hidrolizados lácteos analizados. La presencia de péptidos antioxidantes durante el desarrollo de *E. faecalis* de diversos orígenes en LDV no se había determinado ni descrito previamente.

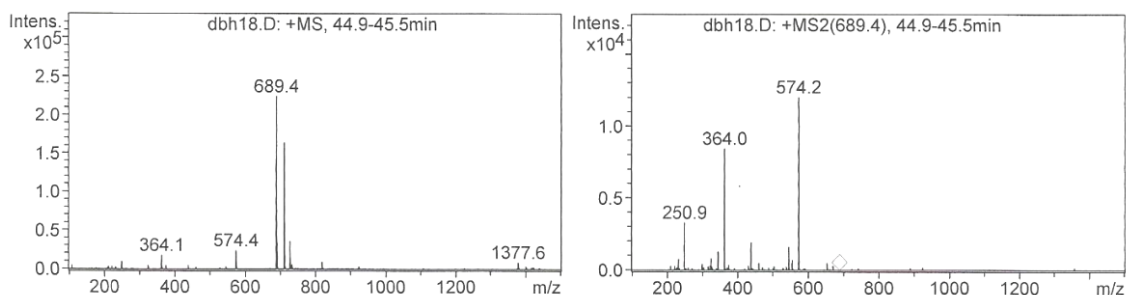


Fig. 8.1. Espectro por RP-HPLC-MS/MS del péptido LHLPLP (m/z 689,4) (A). Espectro del ión m/z 689,4 cargado (B). La secuencia aminoacídica del péptido LHLPLP se deduce del tamaño molecular de los fragmentos iónicos observados en el espectro.

No obstante, el perfil de péptidos mayoritarios de los hidrolizados lácteos producidos por las cepas de *E. faecalis* evaluadas manifestó pequeñas variaciones debido a las complejas interacciones entre el desarrollo de los enterococos, su actividad proteolítica y la hidrólisis del sustrato. En este contexto, varios de los fragmentos peptídicos mayoritarios derivados de la β -CN bovina como los péptidos RELEE [f(1-5)], FAQTQS [f(52-57)], LHLPLP [f(133-138)], VLPVPQK [f(170-176)] y VRGPFPIIV [f(201-209)] se identificaron en todos los hidrolizados lácteos analizados mientras otros péptidos derivados de la β -CN como los péptidos VLGPVRGPF [f(88-97)], VSKVKET [f(95-101)], LTDVEN [f(127-132)] y VLGPVRGPF [f(197-206)] se identificaron menos frecuentemente (**Tabla 3.3**). No obstante, a pesar de las diferencias entre los perfiles peptídicos de los hidrolizados lácteos producidos por las cepas de *E. faecalis* evaluadas todos ellos contenían, al menos, los péptidos LHLPLP y VRGPFPIIV inhibidores de la ECA y el péptido antioxidante VLPVPQK.

8.1.2. Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes libres de células de diversas cepas de *E. faecalis*

Los hidrolizados lácteos de las cepas de *E. faecalis* desarrolladas en LDV mostraron halos de actividad antimicrobiana frente a *P. damnosus* CECT4797 y *L. ivanovii* CECT913 (**Fig. 3.1**). Sin embargo, *E. faecalis* DBH18 fue la única cepa que, además, manifestó actividad antimicrobiana tras su desarrollo en MRS posiblemente debido a su demostrada actividad bacteriocinogénica (Sánchez y col., 2007). El que las cepas de *E. faecalis* puedan producir hidrolizados lácteos con diversas actividades biológicas no debería resultar sorprendente si se considera la existencia de

numerosas secuencias peptídicas encriptadas en las caseínas con el potencial de manifestar múltiples actividades biológicas (Meisel y col., 2006). Muchas de las cepas de *E. faecalis* evaluadas en este trabajo producen hidrolizados lácteos con una elevada AI-ECA, actividad antioxidante y actividad antimicrobiana. Asimismo, de los resultados descritos se deduce el potencial biotecnológico de estas cepas como factorías celulares de producción de péptidos bioactivos potencialmente beneficiosos para la salud o como probióticos con aplicaciones en la industria alimentaria, en medicina humana y veterinaria y en producción animal.

8.1.3. Factores de virulencia y resistencia a antibióticos

Los enterococos desempeñan un papel beneficioso en el desarrollo de las características sensoriales de los alimentos fermentados y algunos se utilizan como probióticos (Franz y col., 2011). Sin embargo, los enterococos son también colonizadores del tracto gastrointestinal de los mamíferos y otras especies biológicas con estilos de vida que fluctúan de simbiosis intestinales a patógenos multirresistentes a antibióticos y responsables de infecciones nosocomiales (Willems y col., 2011). Por ello, conviene evaluar la posible presencia de factores potenciales de virulencia en las cepas de *E. faecalis* productoras de hidrolizados lácteos con elevada AIECA, péptidos antihipertensivos y otros péptidos bioactivos durante su desarrollo en LDV.

De los resultados de este trabajo se deduce que el número de genes que codifican factores potenciales de virulencia en las cepas de *E. faecalis* de origen alimentario y ambiental fue menor, que en las de origen clínico evaluadas como referencia (**Tabla 3.4**). De las cepas de *E. faecalis* evaluadas, sólo *E. faecalis* SDM37 y *E. faecalis* SDP10 codifican los genes *cylLMAB* para la síntesis, secreción y maduración de la citolisina (precursores de una hemolisina-bacteriocina) y que, generalmente, se encuentran codificados en plásmidos o islas de patogenicidad (Coburn y col., 2004; Coburn y col., 2007) (**Tabla 3.4**). Los mecanismos biológicos de inserción/delección que implican la inactivación o ausencia de los genes *cyl* así como las posibles divergencias en la secuencia de los genes que codifican las subunidades estructurales de la citolisina activa, ayudan a comprender las dificultades que supone abordar el estudio de los genes relacionados con su producción (Pillar y Gilmore, 2004). Además, la expresión de los genes *cylLMAB* se asocia a cepas de *E. faecalis* más virulentas en modelos animales que las isogénicas carentes de dichos genes. Por otra parte, todas las cepas de *E. faecalis* evaluadas en este trabajo son portadoras del gen que codifica la proteína Ace, un componente de la superficie celular bacteriana que reconoce proteínas adhesivas de células eucariotas y participa en las etapas iniciales de la infección por enterococos. Asimismo, la mayoría de las cepas (77%) fueron portadoras del gen que codifica una proteína de agregación (Asa1) involucrada en la transferencia de ADN plasmídico (Arias y Murray, 2012). Un porcentaje menor de *E. faecalis* (46%) poseía el gen que codifica la proteína de superficie de enterococos (Esp) que, una vez anclada a la pared celular, participa en la formación de películas superficiales, biopelículas o *biofilms* y que en modelos animales participa en los procesos infecciosos (Shankar y col., 2001) (**Tabla 3.4**). La ausencia de *esp* es, por lo tanto, recomendable en *E. faecalis*. En este contexto, conviene conocer que la cepa probiótica de *E. faecalis* Symbioflor 1 posee los genes *esp* y *asa1* (Domann y col., 2007).

Todas las cepas de *E. faecalis* productoras de hidrolizados lácteos con una elevada AI-ECA son portadoras de los genes *gelE* y *sprE* que codifican las proteasas gelatinasa y serina proteasa, respectivamente. A pesar de que la presencia de genes *gelE* silentes no es inusual en *E. faecalis* de diverso origen (Eaton y Gasson, 2001; Silva Lopes y col., 2006), todas las cepas de *E. faecalis* con el genotipo *gelE*⁺ hidrolizaron tanto la gelatina como las caseínas bovinas. Diversos estudios proteómicos han revelado que los patrones de expresión de proteínas extracelulares de *E. faecalis* de origen alimentario y clínico difieren significativamente. Sin embargo, tanto la GelE como la SprE se detectaron siempre en los sobrenadantes de cepas de ambos orígenes, lo que sugiere que la expresión de dichas proteasas es específica de cepas y no solo representativa de los aislados clínicos. Por otra parte, varios análisis genéticos han revelado que para que las proteasas de *E. faecalis* se expresen correctamente no sólo tienen que poseer los genes estructurales *gelE* y *sprE*, sino también los genes reguladores *fsrABCD* (Pessione y col., 2012).

La producción de feromonas sexuales por *E. faecalis* como resultado de la expresión de los genes *ccf*, *cob* y *cpd* tampoco es un rasgo deseable ya que éstas podrían promover la adquisición de resistencias a antibióticos y, contribuir así, a incrementar su virulencia (Eaton and Gasson, 2001). En este estudio, la presencia de los genes *ccf* y *cpd* se ha detectado en todas las cepas de *E. faecalis* evaluadas mientras que el gen *cob* sólo se encontraba en algunas de ellas. Por lo que respecta a la producción de aminas biógenas, la presencia de los genes que codifican la histidina descarboxilasa (*hdc*) y ornitina descarboxilasa (*odc*) no se detectó en ninguna de las cepas de *E. faecalis* analizadas. Sin embargo, se observó la amplificación del gen de la tirosina descarboxilasa (*tdc*) lo que coincide con la consideración de que la síntesis de tiramina es una característica de la especie *E. faecalis* (Ladero y col., 2012). Por último, las cepas de *E. faecalis* fueron susceptibles a la mayoría de los antibióticos de uso clínico y veterinario evaluados, aunque mostraron resistencia a la eritromicina (concentración mínima inhibitoria, CMI <4 µg/ml) y rifampicina (CMI <2 µg/ml).

8.1.4. Similitud e identidad genética de las cepas de *E. faecalis* evaluadas

La patogenidad de los enterococos se asocia ligada a codificar factores potenciales de virulencia y a la adquisición de genotipos de resistencia a antibióticos, todo ello favorecido por la plasticidad de sus genomas y la ausencia de repeticiones palindrómicas cortas regularmente dispuestas formando una matriz (CRISPR del inglés, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) que servirían de protección frente al ADN exógeno (Ogier y Serror, 2008; Arias and Murray, 2012). Asimismo, la virulencia de los enterococos requiere, por una parte, la existencia de un hospedador susceptible y, por otra, constituye el reflejo de un paulatino proceso de selección de aquellos clones o variantes bacterianas con un elevado potencial patógeno. Es más, la existencia de múltiples factores de virulencia podría contribuir a su competitividad en diferentes nichos ecológicos. En este contexto, los estudios epidemiológicos con cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* se han realizado, principalmente, mediante su análisis genómico por PFGE y MLST. Por otra parte, los estudios basados en la técnica de MLST también han demostrado que existe una relación positiva entre complejos clonales específicos e infecciones nosocomiales

en personas originadas por *E. faecalis* (Ruiz-Garbajosa y col., 2006; Arias y Murray, 2012; Galloway-Peña y col., 2012).

En este estudio, el análisis por PFGE de los fragmentos génicos derivados de las cepas de *E. faecalis* evaluadas mostró claras diferencias genéticas entre las de origen alimentario y origen clínico. Por otra parte, las cepas de *E. faecalis* de origen alimentario y ambiental se agruparon en un grupo mayoritario independiente separado del grupo formado por las cepas clínicas de referencia de *E. faecalis* P4 y *E. faecalis* P36 (**Fig. 3.2**). Igualmente, la comparación de los perfiles alélicos de *E. faecalis* DBH18 y *E. faecalis* QA53 en la base de datos de *E. faecalis* permitió identificar ambas cepas con la secuencia tipo (ST, del inglés *Sequence Type*) ST167 y ST165, respectivamente. La cepa de *E. faecalis* DBH18 con la secuencia tipo ST167 no manifiesta afinidad genética con ningún otro ST mientras que la cepa de *E. faecalis* QA53, con la secuencia tipo ST165, difiere en un solo *locus* con la cepa de *E. faecalis* de la secuencia tipo ST226, aislada en Noruega y responsable de infecciones en personas. En todo caso, ninguna de las dos cepas de *E. faecalis* DHH18 y *E. faecalis* QA53 caracterizadas por MLST se incluye en los complejos clonales CC2 y CC9 que agrupan a los *E. faecalis* de origen hospitalario.

8.1.5. Efecto del tiempo y temperatura en la producción de hidrolizados lácteos con AI-ECA y en la liberación de PI-ECA por diversas cepas de *E. faecalis*

E. faecalis DBH18 y *E. faecalis* QA53, dos de las cepas evaluadas con menor número de factores de virulencia y genotípicamente diferentes de los *E. faecalis* de origen hospitalario, se desarrollaron en LDV a diferentes temperaturas (32, 37 y 45 °C) y tiempos (24, 48, 72, 96, 120 y 144 h), para determinar la AI-ECA de los hidrolizados lácteos generados. Los resultados obtenidos demostraron que la AI-ECA de los hidrolizados lácteos era mayor a 37°C que a 32°C o 45°C, tras 48 o 96 h de cultivo (**Tabla 3.5**). Dado que los tiempos de fermentación prolongados encarecen los procesos industriales y aumentan las probabilidades de contaminación microbiana, se consideró que el desarrollo de las cepas de *E. faecalis* en LDV a 37°C durante 48 h era el apropiado para la producción de hidrolizados lácteos con una elevada AI-ECA. Igualmente, dado que las cepas de *E. faecalis* de origen alimentario y ambiental producían hidrolizados lácteos de elevada AI-ECA se realizaron experiencias para determinar si las cepas de *E. faecalis* P4, *E. faecalis* P36, *E. faecalis* 3Er1 y *E. faecalis* H10 de origen clínico, poseían la misma capacidad. Para ello, los hidrolizados lácteos de las cepas clínicas de *E. faecalis* y de las de *E. faecalis* DBH18 y *E. faecalis* QA53, utilizadas como controles, se desarrollaron en LDV a 37°C durante 48 h y se filtraron por filtros que permiten la recuperación de la fracción de <3 KDa de masa molecular, con el fin de obtener fracciones potencialmente libres de factores de virulencia de los enterococos. La AI-ECA de las fracciones de <3 KDa de los hidrolizados lácteos producidos por *E. faecalis* DBH18 y *E. faecalis* QA53 (**Tabla 3.6**), fue de dos a tres veces inferior a la AI-ECA de los hidrolizados lácteos sin filtrar aunque seguía siendo elevada (**Tabla 3.5**). El descenso de la AI-ECA de las fracciones filtradas puede deberse a la pérdida de péptidos de mayor masa molecular con AI-ECA sinérgica con la de otros péptidos activos de menor tamaño (Gobbetti y col., 2000). Sin embargo, es importante señalar que los hidrolizados lácteos producidos por el aislado clínico *E. faecalis* P4 poseían una AI-ECA similar a la de los

hidrolizados producidos por *E. faecalis* QA53 y *E. faecalis* DBH18 de origen alimentario y ambiental, respectivamente.

Las fracciones de <3 kDa de los hidrolizados lácteos de los *E. faecalis* de origen alimentario, ambiental y clínico mostraron una elevada AI-ECA con valores de IC₅₀ de entre 24,3 y 38,4 µg de proteína/ml. Los valores IC₅₀ más bajos y, por consiguiente, los de mayor AI-ECA procedían de los hidrolizados lácteos producidos por *E. faecalis* DBH18 de origen ambiental y por *E. faecalis* P4 de origen clínico. Los hidrolizados lácteos producidos por *E. faecalis* H10 del complejo clonal CC2 y por *E. faecalis* 3Er1 del complejo clonal CC9 también mostraron una elevada AI-ECA. Sin embargo, el aislado clínico *E. faecalis* P36 no generó hidrolizados lácteos durante su desarrollo en LDV ni sobrenadantes libres de células con una AI-ECA cuantificable (**Tabla 3.6**). Esta observación es muy interesante ya que la cepa de *E. faecalis* P36 es genotípicamente *gelE*⁺ pero fenotípicamente Gel⁻. Por ello, es posible que la GelE o los genes reguladores *fsr* pudieran estar implicados en la producción de hidrolizados lácteos con actividades biológicas y la liberación de péptidos bioactivos durante el desarrollo de *E. faecalis* de origen alimentario, ambiental y clínico en LDV.

Cuando las fracciones de <3 kDa de los hidrolizados lácteos de las cepas de *E. faecalis* de origen alimentario, ambiental y clínico se evaluaron por RP-HPLC-MS/MS en todas ellas se detectó la presencia de fragmentos peptídicos mayoritarios derivados de las caseínas bovinas, excepto en las fracciones procedentes de *E. faecalis* P36. El 50% de los péptidos mayoritarios identificados en las fracciones de <3 kDa eran idénticos a los identificados previamente en los hidrolizados lácteos sin filtrar. Igualmente, los péptidos VRGPFPIIV y VLGPVRGPFPI inhibidores de la ECA y el péptido VLPVPQK con actividad antioxidante se encontraban en la mayoría de las fracciones analizadas, mientras el péptido antihipertensivo LHLPLP se encontraba en todas ellas (**Tabla 3.7**). Asimismo, el péptido LTQTPVVPPF derivado de la β-CN bovina f(77-87) y de reconocida AI-ECA (Quirós y col., 2007) y que no se había identificado previamente en los hidrolizados lácteos sin filtrar, se identificó en las fracciones de <3 kDa de los hidrolizados lácteos filtrados. De los resultados descritos se deduce que las cepas de *E. faecalis* de origen alimentario, ambiental y clínico producen hidrolizados lácteos de <3 kDa de elevada AI-ECA, debido a la producción de PI-ECAs, así como la producción de otros péptidos bioactivos durante su desarrollo en LDV. Por ello, puede que las cepas de *E. faecalis* de origen clínico no sólo sean responsables de infecciones enterocócicas en pacientes susceptibles y/o inmunodeprimidos sino también, sorprendentemente, productoras de péptidos bioactivos derivados de la hidrólisis de LDV. Asimismo, los resultados de este trabajo sugieren connotaciones saludables derivadas de la producción de péptidos bioactivos durante el desarrollo de *E. faecalis* de origen alimentario, ambiental y clínico en la LDV, su posible papel como comensales en el tracto gastrointestinal de las personas sanas y su posible potencial como probióticos.

8.2. PRODUCCIÓN CONTROLADA DE LA ENTEROLISINA A (EnIA) Y LISIS CELULAR PROGRAMADA DE CÉLULAS RECOMBINANTES DE *Lactococcus lactis*, COMO ESTRATEGIA PARA LA OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS LÁCTEOS, DERIVADOS DE LA LECHE DESNATADA DE VACA, CON ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE LA ANGIOTENSINA (ECA)

RESUMEN

La clonación del gen (*enIA*) de la enterolisina A (EnIA) de *E. faecalis* DAC9 en el vector de expresión proteica pMLG2, derivado del pMSP3545 y que codifica la EnIA bajo el control del promotor inducible P_{nisA} , permitió la producción heteróloga y liberación controlada de la EnIA por *L. lactis* subesp. *cremoris* NZ9000 y *L. lactis* subesp. *lactis* IL1403. La expresión del gen *enIA*, inducido por la nisina por las cepas recombinantes *L. lactis* NZ9000 (pMLG2) y *L. lactis* IL1403 (pMLG2), desarrolladas en leche desnatada de vaca (LDV), originó una reducción de la densidad óptica (DO_{600}) de los cultivos y del número de células viables. Sin embargo, solamente los hidrolizados lácteos derivados del desarrollo de *L. lactis* IL1403 (pMLG2) en LDV a las 48 h de su inducción con nisina mostraron una mayor actividad inhibidora de la ECA (AI-ECA) que la de las cepas control. El análisis de los hidrolizados lácteos por RP-HPLC-MS/MS (del inglés, *Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*) permitió la determinación del perfil peptídico de los péptidos mayoritarios liberados y la identificación de aquéllos con AI-ECA conocida o que comparten, al menos, tres residuos aminoacídicos de su región C-terminal con péptidos con una AI-ECA previamente descrita.

8.2.1. Construcción del plásmido pMLG2 derivado del vector de expresión proteica pMSP3545 y producción heteróloga de la enterolisina A (EnIA)

En este trabajo, el gen *enIA* de *E. faecalis* DAC9 (Sánchez y col., 2007) se clonó en el vector de expresión proteica pMSP3545 originando el plásmido derivado pMLG2 que codifica la enterolisina A (EnIA) madura (Fig. 8.2).

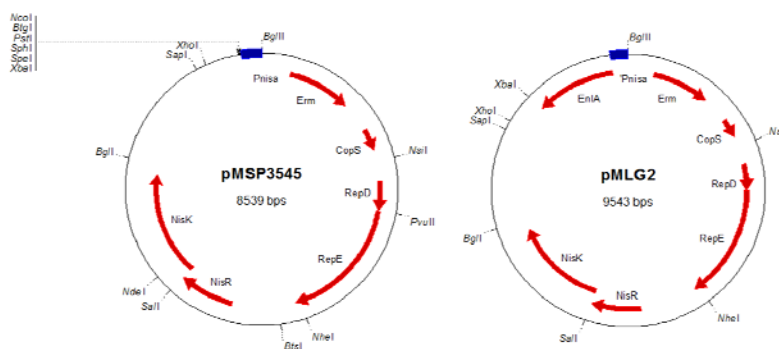


Fig. 8.2. Mapa genético del plásmido pMLG2 derivado del vector de expresión proteica pMSP3545 con el promotor P_{nisA} inducible por la nisina A (NisA), el gen que codifica la enterolisina A (EnIA) y los genes que codifican las proteínas NisR y NisK de regulación de la síntesis de EnIA por la NisA.

La EnIA es una bacteriocina sensible al calor de la clase III, producida por *E. faecalis*, que hidroliza la pared celular de numerosas bacterias Gram-positivas incluyendo *L. lactis* (Hickey y col., 2003; Nilsen y col., 2003). Asimismo, el gen estructural (*enIA*) de la EnIA codifica una preproteína de 343 aminoácidos, con un péptido señal (PS) de 27 aminoácidos y la EnIA madura de 316 aminoácidos con una masa molecular de 34,5 KDa (Nilsen y col., 2003). La EnIA se caracteriza por una mayor capacidad lítica de la pared celular que la que posee la proteína AcmA, la autolisina mayoritaria de *L. lactis*, y varias holinas y lisinas sintetizadas por bacteriófagos (Hickey y col. 2004). Por otra parte, el plásmido pMSP3545 es un vector de expresión proteica optimizado para la expresión controlada por la nisina (NICE, del inglés *Nisin Controlled Expression System*) de genes que codifican péptidos o proteínas por BAL de diversos géneros y especies. El plásmido pMSP3545 contiene el promotor P_{nisA} y los genes que codifican las proteínas NisK y NisR del sistema de señalización de tres componentes lo que permite la transcripción de los genes fusionados a dicho promotor en presencia de la nisina como el péptido inductor de la expresión génica (Kuipers y col., 1998; Bryan y col., 2000). A pesar de que la producción de EnIA obtenida con el sistema NICE puede ser menor con vectores derivados del plásmido pMSP3545 que con los derivados del plásmido pNZ8048, debido al menor número de copias por el origen de replicación de pMSP3545 (Kim y Mills, 2007), los vectores derivados de pMSP3545 se transfieren por transformación a un mayor número de *L. lactis* y otras BAL sin que los genes *niskR* de la señal de transducción se integren en su cromosoma porque ya lo están en el vector pMSP3545 (Mierau y col., 2005; Borrero y col., 2011).

Asimismo, *L. lactis* es un microorganismo industrial con estatus GRAS (del inglés, *Generally Recognized As Safe*) y QPS (del inglés, *Qualified Presumption of Safety*) cuyo uso en posibles aplicaciones biotecnológicas es cada vez mayor. A su vez, *L. lactis* subesp. *lactis* IL1403 es una cepa libre de plásmidos derivada de *L. lactis* IL594 (Chopin y col., 1984) mientras *L. lactis* subesp. *cremoris* NZ9000 deriva de *L. lactis* MG1363 por integración de los genes *niskR* en el gen *pepN* para la producción inducible y controlada de péptidos y proteínas mediante el sistema NICE (Kuipers y col., 1998). Además, ambas cepas se consideran modelos experimentales de elección en numerosos estudios de genómica y proteómica (Linares y col., 2010). En este trabajo, el diseño y construcción de las cepas recombinantes de *L. lactis* NZ9000 (pMSP3545), *L. lactis* NZ9000 (pMLG2), *L. lactis* IL1403 (pMSP3545) y *L. lactis* IL1403 (pMLG2) permitió la producción y expresión funcional de la EnIA y su determinación mediante la reducción de la densidad óptica (DO_{660}) de los cultivos, en ausencia o presencia de nisina, durante su desarrollo en el medio GM17. La adición de nisina a los cultivos de *L. lactis* NZ9000 (pMLG2) y *L. lactis* IL1403 (pMLG2), desarrollados en GM17, originó una reducción evidente de su DO_{660} en comparación con los cultivos control de *L. lactis* NZ9000 (pMSP3545) y *L. lactis* IL1403 (pMSP3545) (**Fig. 4.1**). Los cultivos de *L. lactis* NZ9000 (pMLG2) y *L. lactis* IL1403 (pMLG2) mostraron una reducción de su DO_{660} del 82% al 85% y del 69% al 80%, respectivamente, tras 90 y 180 min desde la inducción con nisina. Asimismo, el porcentaje de muerte celular de los cultivos de *L. lactis* NZ9000 (pMGL2) y *L. lactis* IL1403 (pMLG2) tras 90 y 180 min de la inducción con nisina fue del 93% al 99% y del 87% al 99%, respectivamente. Las células supervivientes serían aquellas resistentes a la EnIA o incapaces de producir niveles elevados de EnIA.

Muchas BAL, incluidos los lactococos, producen PI-ECA durante su desarrollo en sustratos lácteos (Nielsen y col., 2009). En este contexto, se considera que el sistema proteolítico de las BAL hidroliza las proteínas hasta aminoácidos libres en tres pasos: (a) las caseínas son hidrolizadas por las proteinasas ligadas a la pared celular (CEP o PrtP) hasta liberar péptidos de tamaño variable; (b) los péptidos son transportados al interior celular mediante sistemas específicos de transporte de oligopéptidos; y (c) una vez en el interior celular los péptidos siguen siendo hidrolizados hasta péptidos de menor tamaño y aminoácidos libres por gran una variedad de peptidasas con especificidades distintas aunque, en ocasiones, se solapan (Lamarque y col., 2001; Savijoki y col., 2006; Muñoz-Tamayo y col., 2011). Asimismo, aunque se conoce que *L. lactis* no es una especie particularmente proteolítica algunas cepas lo son más que otras con grandes diferencias entre las cepas salvajes en lo que respecta a sus actividades proteolíticas y liberación de PI-ECA (Nielsen y col., 2009; Picón y col., 2010; Pihlanto y col., 2010; Otte y col., 2011). También se ha descrito que *L. lactis* libera PI-ECA únicamente por la actividad de proteasas extracelulares mientras en otros casos son el resultado de la actividad conjunta de proteasas y peptidasas intracelulares (Nielsen y col., 2009).

Por ello, de gran interés científico y aplicado sería el diseño genético y construcción de cepas de *L. lactis* subesp. *lactis* y *L. lactis* subesp. *lactis* IL1403 productoras heterólogas de la EnIA y cuya liberación controlada mediante la inducción con nisina permita la lisis de las células productoras y la liberación de proteinasas y peptidasas intracelulares o asociadas a su pared celular y, posiblemente, involucradas en la producción de hidrolizados lácteos con AI-ECA, debido a la liberación de PI-ECA durante su desarrollo en LDV. Para ello, los cultivos recombinantes de *L. lactis* desarrollados en LDV se indujeron con nisina y se determinó el desarrollo microbiano y la supervivencia celular desde las 3 hasta las 48 h de la adición de nisina. Los resultados obtenidos mostraron que la incorporación de nisina a los cultivos originó un descenso notable del número de células de *L. lactis*, transformadas con pMLG2 frente a aquellas transformadas con pMSP3545, así como una reducción importante del porcentaje de células supervivientes de *L. lactis* NZ9000 (pMLG2) y *L. lactis* IL1403 (pMLG2) (**Fig. 4.2**). La reducción del número de células viables de los cultivos desarrollados en LDV fue evidente tras 9 h de incubación. Asimismo, a las 24 h de la inducción con nisina el porcentaje células viables fue del 0,07% y 0,015% para *L. lactis* NZ9000 (pMLG2) y *L. lactis* IL1403 (pMLG2), respectivamente. El que el tiempo requerido para la expresión funcional de la EnIA en los cultivos desarrollados en LDV fuese mayor que el requerido para su expresión en los cultivos desarrollados en GM17, podría deberse a la influencia de la composición del medio de cultivo en la producción inducible de proteínas mediante el sistema NICE (Mierau y col., 2005; Berlec y col., 2008). En este contexto se sospecha que, de los componentes de la LDV, los iones calcio divalentes podrían inhibir la acción de la nisina (Houlihan y Russell, 2006). Por ese motivo, en este trabajo la concentración de nisina utilizada en las experiencias de inducción de los cultivos de *L. lactis* elevó de 10 ng nisina/ml (cantidad recomendada) a 40 ng nisina/ml (Mierau y col., 2005).

8.2.2. Determinación de la AI-ECA y del perfil peptídico de los hidrolizados lácteos generados tras la lisis inducida de los cultivos recombinantes de *L. lactis*, productores de enterolisina A (EnIA), e identificación de los péptidos mayoritarios liberados

Como la producción heteróloga y expresión funcional de la EnIA durante el desarrollo de las cepas recombinantes de *L. lactis* en LDV fue muy eficaz, de interés fue determinar la AI-ECA de los hidrolizados lácteos resultantes. De los resultados obtenidos, se determinó que la mayor AI-ECA se observó en los hidrolizados lácteos procedentes del desarrollo de *L. lactis* IL1403 (pMLG2) en LDV (**Tabla 4.1**).

Asimismo, la evaluación por RP-HPLC (del inglés, *Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography*) de los perfiles peptídicos de los hidrolizados lácteos producidos por *L. lactis* NZ9000 (pMLG2) y *L. lactis* IL1403 (pMLG2), durante su desarrollo en LDV, reveló la existencia de un mayor número de fracciones peptídicas en los hidrolizados lácteos generados por *L. lactis* IL1403 (pMLG2) a las 48 h de su inducción con nisina (**Fig. 4.3**). Las diferencias en la AI-ECA y en los perfiles peptídicos de los hidrolizados lácteos producidos por ambas cepas recombinantes seguramente se deben a las diferencias genómicas entre *L. lactis* NZ9000 y *L. lactis* IL1403 (Bolotin y col., 2001; Linares y col., 2010). En este contexto, experiencias de hibridación genómica comparativa (HGC) han identificado diferencias significativas en el sistema proteolítico de las BAL y los resultados obtenidos sugieren, además, que sus actividades proteolíticas no solamente podrían diferir entre especies sino entre cepas de la misma especie (Liu y col., 2010). Además, la clonación de *nisRK* en el gen *pepN* de *L. lactis* NZ9000 (Kuipers y col., 1998) elimina la producción de la peptidasa intracelular PepN y, probablemente, la de otras peptidasas debido a efectos genéticos polares. En este contexto, quesos producidos con cepas de *L. lactis* que sobreexpresaban *pepN* o *pepC* han obtenido mejores puntuaciones en lo relativo al sabor y amargor que aquellos en las que expresión de ambos genes era menor lo que, de nuevo, resalta el papel de las peptidasas endógenas en la hidrólisis de proteínas lácteas y en la liberación de péptidos con características tecnológicas y biológicas de interés (Guldfeldt y col., 2001).

Igualmente, el análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con columnas cromatográficas de fase inversa (RP-HPLC) acoplada a espectrometría de masas en tándem con ionización de las muestras por electrospray (RP-HPLC-MS/MS) de los fragmentos peptídicos mayoritarios identificados en los hidrolizados lácteos generados por *L. lactis* IL1403 (pMLG2) a las 48 h de la inducción con nisina, identificó la presencia de péptidos derivados de la β -CN, α_{s1} -CN y α_{s2} -CN bovinas (**Tabla 4.2**). El análisis exhaustivo de los fragmentos peptídicos de los cromatogramas generados propició la identificación de péptidos con AI-ECA previamente descrita o que compartían, al menos, 3 residuos aminoacídicos de su región C-terminal con otros péptidos con AI-ECA conocida (Cheung y col., 1980). Los péptidos con AI-ECA identificados fueron los péptidos EMPFPK [f(108-113)] y KEMPFPK [f(107-113)] derivados de la β -CN bovina, los péptidos EVFGK [f(30-34)], NENLLRF [f(17-23)] y FVAPFPGEVFGK [f(24-34)] derivados de la α_{s1} -CN bovina, y los péptidos KPWIQPK [f(191-197)] y AMKPWIQPKKVIPYVRYL [f(189-207)] derivados de la α_{s2} -CN bovina (Karaki y col., 1990; Maeno y col., 1996; Quirós y col., 2005; Fitzgerald y Murray, 2006; Hernández-Ledesma y col., 2011) (**Tabla 4.2**). El péptido VKEAMAPK [β -caseína, f(98-105)] con actividad antioxidante conocida (Rival y col., 2001) también fue otro de los péptidos identificados en los hidrolizados lácteos de *L. lactis* IL1403 (pMLG2) durante su desarrollo en LDV.

De los resultados de este trabajo se deduce que la liberación controlada y expresión funcional de la bacteriocina lítica EnIA por las cepas recombinantes de *L. lactis* subesp. *cremoris* NZ9000 y *L. lactis* subesp. *lactis* IL1403 origina, durante su desarrollo en LDV, una reducción notable del número de células viables. Sin embargo, sólo los hidrolizados generados por la lisis inducida de *L. lactis* IL1403 (pMLG2), desarrolladas en LDV durante 48 h, mostraron una AI-ECA más elevada que el resto de hidrolizados lácteos. Asimismo, el análisis por RP-HPLC-MS/MS de los hidrolizados lácteos de *L. lactis* IL1403 (pMLG2) permitió la identificación entre los fragmentos peptídicos mayoritarios de diversos PI-ECAs y de un péptido antioxidante. De interés podría también ser, en un futuro próximo, identificar en los hidrolizados lácteos previamente descritos la posible presencia de metabolitos bacterianos con AI-ECA y de otros péptidos con actividades biológicas aún desconocidas. Por otra parte, el vector pMLG2 construido durante la realización de este trabajo y que codifica la EnIA biológicamente activa podría mostrar su utilidad en la producción de PI-ECAs y otros péptidos bioactivos durante la lisis inducida por nisina de muchas otras BAL recombinantes transformadas con pMLG2, durante su desarrollo en diferentes sustratos alimentarios.

8.3. EVIDENCIA GENÉTICA Y BIOQUÍMICA DE QUE CEPAS RECOMBINANTES DE *Enterococcus* spp. QUE EXPRESAN LA GELATINASA (GelE), PRODUCIDA POR *E. faecalis* DBH18, PRODUCEN HIDROLIZADOS LÁCTEOS DERIVADOS DE LA LECHE DESNATADA DE VACA CON ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE LA ANGIOTENSINA (ECA) Y PÉPTIDOS ANTIHIPERTENSIVOS

RESUMEN

Los genes que codifican la gelatinasa (*gelE*) y la serina proteasa (*sprE*), dos proteasas extracelulares producidas por *E. faecalis* DBH18, se clonaron en el vector de expresión proteica pMG36c con el promotor constitutivo P₃₂, para generar los plásmidos recombinantes pCG, pCSP y pCGSP que codifican los genes *gelE*, *sprE* y *gelE-sprE*, respectivamente. La transformación de cepas no caseinolíticas de *E. faecalis* P36, *E. faecalis* JH2-2, *E. faecium* AR24 y *E. hirae* AR14 con los plásmidos descritos y con el plásmido control pMG36c, permitió la detección de actividad caseinolítica sólo en las cepas transformadas con pCG y pCGSP. El diseño genético y obtención de un mutante por delección (*knockout*) de *E. faecalis* V583 (Δ *gelE*) para la producción de GelE y la recuperación de su actividad caseinolítica por complementación con el plásmido pCG, confirmaron que la GelE es responsable de la actividad caseinolítica de *E. faecalis* V583 Δ *gelE* (pCG) durante su desarrollo en leche desnatada de vaca (LDV). Igualmente, sólo los *Enterococcus* spp. transformados con pCG o pCGSP produjeron hidrolizados lácteos con una elevada actividad inhibidora de la ECA (AI-ECA) durante su desarrollo en LDV. Por otra parte, el análisis por RP-HPLC-MS/MS (del inglés, *Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*) de los hidrolizados lácteos de las cepas recombinantes de *Enterococcus* spp. con una elevada AI-ECA permitió la identificación de 38 fragmentos peptídicos mayoritarios incluyendo péptidos de conocida AI-ECA, actividad antihipertensiva y actividad antioxidante.

8.3.1. Hidrólisis de la gelatina y de caseínas de la leche desnatada de vaca (LDV) por *E. faecalis* de diversos orígenes

Se sabe que las BAL producen una gran variedad de péptidos bioactivos entre los que se encuentran aquellos con AI-ECA como resultado de la actividad de proteasas extracelulares, proteinasas asociadas a la pared celular y peptidasas intracelulares (Korhonen y Pihlanto, 2006; Hebert y col., 2008; Otte y col., 2011). Sin embargo, pocos estudios se han centrado en el papel que desempeñan las BAL más allá de *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. y *Streptococcus* spp. en la producción de péptidos con AI-ECA (PI-ECAs) durante su desarrollo en la leche u otros sustratos proteicos (Gobbetti y col., 2010; Otte y col., 2011). Por ello, en este estudio se evaluó la producción de gelatinasa y la actividad caseinolítica de cepas bien caracterizadas de *E. faecalis* de origen alimentario, ambiental y clínico. La visualización de halos de hidrólisis alrededor de colonias de *E. faecalis* DBH18, *E. faecalis* QA53, *E. faecalis* P4, *E. faecalis* 3Er1 y *E. faecalis* H10 desarrolladas tanto en placas de cultivo con gelatina como en las que contenían LDV, resultó indicativo de su actividad gelatinasa y caseinolítica. Sin embargo, la ausencia de estas actividades enzimáticas en la cepa de *E. faecalis* P36 durante su desarrollo en placas con gelatina o LDV, así como el reconocimiento de ser una cepa con el genotipo *gelE*⁺ y *sprE*⁺ y el

fenotipo GelE⁻ (Eaton y Gasson, 2001), sugieren que la GelE, SprE y/o mutaciones en los genes reguladores *fsr* podrían tener un papel importante en la hidrólisis de gelatina y caseínas bovinas y, por extensión, en la producción de hidrolizados lácteos con elevada AI-ECA debido a la liberación de PI-ECA durante el desarrollo de *E. faecalis* de distintos orígenes en LDV (sección 8.1) (Fig. 5.1).

8.3.2. Producción heteróloga y expresión funcional de la gelatinasa (GelE) y la serina proteasa (SprE), producidas por *E. faecalis* DBH18, por cepas recombinantes de *Enterococcus* spp.

Para la caracterización genética y bioquímica del posible papel de la GelE y SprE en la actividad caseinolítica de cepas recombinantes de *Enterococcus* spp. durante su desarrollo en LDV los genes de *E. faecalis* DBH18 que codifican la GelE (*gelE*), SprE (*sprE*) y GelE-SprE (*gelE-sprE*) se clonaron en el vector de expresión proteica pMG36c para generar los plásmidos derivados pCG (*gelE*), pCSP (*sprE*) y pCGSP (*gelE-sprE*) (Fig. 8.3).

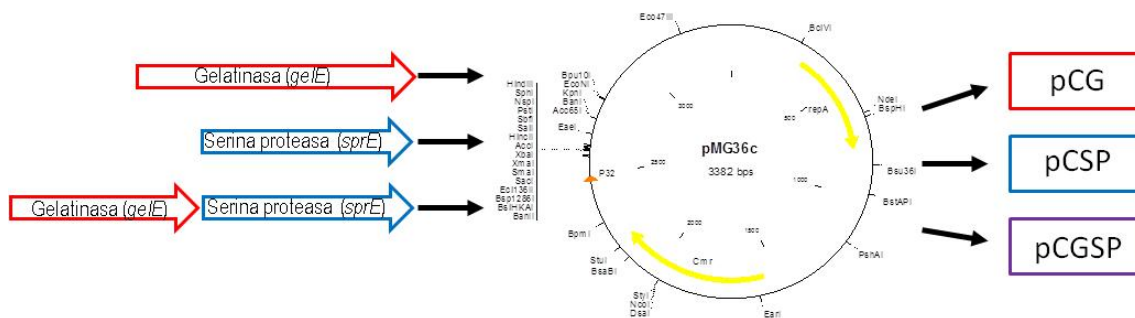


Fig. 8.3. Construcción de los plásmidos recombinantes pCG, pCSP y pCGSP derivados del vector de expresión proteica pMG36c.

Como se ha descrito en otras secciones de esta memoria, *E. faecalis* DBH18 es una cepa bacteriocinogénica productora de hidrolizados lácteos de elevada AI-ECA cuando se desarrolla en LDV y que codifica menos factores potenciales de virulencia que otros *E. faecalis* de origen alimentario, ambiental y clínico. Igualmente, el vector de expresión proteica pMG36c capaz de replicar en *E. coli*, *B. subtilis* y numerosas BAL contiene el origen de replicación del plásmido pWV01 y el promotor P₃₂ que hace posible la transcripción constante y constitutiva de los genes insertados en el sitio de clonación múltiple del plásmido pUC18 (van de Guchte y col., 1989). En este trabajo, la transformación de cepas no caseinolíticas de *E. faecalis* P36 (Eaton and Gasson, 2001), *E. faecalis* JH2-2 (Mohamed y Murray, 2006), *E. faecium* AR24 y *E. hirae* AR14 con los plásmidos pCG y pCGSP, pero no con los plásmidos pMG36c o pCSP, dio lugar a la formación de halos, indicadores de hidrólisis de las caseínas, en placas de cultivo con LDV en las que se desarrollaron las colonias recombinantes de *Enterococcus* spp. (Fig. 5.2). Las colonias de *E. faecalis* DBH18, transformadas con los plásmidos pCG o pCGSP produjeron los halos de mayor tamaño (Fig. 5.2). La sutil actividad caseinolítica (halos de <2 mm de diámetro) producida por *E. faecalis* JH2-2, *E. faecium* AR24 y *E. hirae* AR14 transformados con el plásmido control pMG36c, posiblemente, se corresponda con un fenotipo proteolítico débil. También se observó que la

actividad caseinolítica de *E. faecium* AR24 transformado con pCG y de *E. hirae* AR14 transformado con pCG y pCGSP, fue menor que la producida por las cepas recombinantes de *E. faecalis* (**Fig. 5.2**). Desafortunadamente y, a pesar de numerosos intentos, no fue posible obtener la cepa recombinante de *E. faecium* AR24 (pCGSP). Sin embargo, de gran importancia resulta observar la ausencia de actividad caseinolítica por las cepas de *Enterococcus* spp. transformadas con el plásmido pCSP. Por ello, de los resultados descritos se deduce que las cepas recombinantes de *Enterococcus* spp. que codifican *gelE* pero no *sprE* hidrolizan las caseínas bovinas durante su desarrollo en LDV. A pesar de que estudios previos demuestran que la SprE es activa frente a múltiples sustratos proteicos (Kawalec y col., 2005) y que *sprE* contribuye a la virulencia de los enterococos que lo codifican en modelos de infección animales (Qin y col., 2000; Engelbert y col., 2004), los resultados de este trabajo sugieren que la SprE, por sí misma, no está implicada en la hidrólisis de las caseínas bovinas. Por ello, aunque la coexpresión de *gelE* y *sprE* por *E. faecalis* conlleve ciertas ventajas como el efecto positivo de la GelE en la maduración de la SprE (Kawalec y col., 2005) o la función de la SprE como proteína de inmunidad frente a la acción letal de la GelE en el mecanismo fraticida propuesto para la producción de biopelículas o *biofilms* por *E. faecalis* (Thomas y col., 2009), el papel de SprE en la hidrólisis de las caseínas bovinas es todavía desconocido.

Por otra parte, el papel de la GelE en la hidrólisis de las caseínas bovinas también se determinó mediante experiencias de complementación genética en las que el plásmido pCG (*gelE*) restauró la actividad caseinolítica de una cepa de *E. faecalis* V583 (GelE⁺, SprE⁺), genéticamente modificada por delección puntual (*knockout*) de *gelE* (gen noqueado) y su conversión en *E. faecalis* Δ *gelE* (GelE⁻, SprE⁺), con pérdida de su actividad caseinolítica. Para la delección de *gelE* se utilizó el vector lanzadera pAS222 con el replicón termosensible pG⁺ host4 (Maguin y col., 1996; Jönson y col., 2009) y por doble recombinación con el vector pAS222-KO-GEL, transformado en *E. faecalis* V583, se obtuvo la cepa de *E. faecalis* V583 Δ *gelE* sin actividad caseinolítica. Finalmente, la transformación de *E. faecalis* V583 Δ *gelE* con los plásmidos pCG o pCGSP, pero no con los plásmidos pMG36c o pCSP, resultó en la producción por *E. faecalis* V583 Δ *gelE* transformada con pCG o pCGSP de halos indicativos de su actividad caseinolítica tras su desarrollo en placas con LDV y, por tanto, en la recuperación por complementación genética del fenotipo GelE⁺ (**Fig. 5.2**).

Ya que la GelE se produce generalmente por cepas de *E. faecalis* que codifican factores potenciales de virulencia y poseen genes de resistencia antibióticos las cepas recombinantes de *E. faecium* y/o *E. hirae* desarrolladas en este trabajo podrían resultar una alternativa interesante para la producción y expresión funcional de la GelE por enterococos más seguros que *E. faecalis*. Además, ya que el péptido señal de la GelE (PS_{gelE}) se ha mostrado eficaz para dirigir el procesamiento, transporte y expresión funcional de la GelE por cepas recombinantes de *Enterococcus* spp. el posible uso de quimeras génicas del PS_{gelE} fusionado a la secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica madura de otras enzimas, proteínas o péptidos de interés biotecnológico podría permitir su clonación, producción y expresión funcional por diversos enterococos y, posiblemente, otras BAL de interés (Borrero y col., 2011).

8.3.3. Actividad inhibidora de la ECA de los hidrolizados lácteos generados por el desarrollo de las cepas recombinantes de *Enterococcus* spp. en leche desnatada de vaca (LDV)

El desarrollo de las cepas recombinantes de *E. faecalis* P36, *E. faecalis* JH2-2, *E. faecium* AR24, *E. hirae* AR14 y *E. faecalis* DBH18 transformadas con los plásmidos pMG36c, pCG, pCGSP o pCSP permitió la determinación de la AI-ECA de los hidrolizados lácteos resultantes durante su desarrollo en LDV. No obstante, de las cepas recombinantes de *Enterococcus* spp. analizadas sólo aquellas transformadas con los plásmidos pCG o pCGSP produjeron hidrolizados lácteos con una elevada AI-ECA y valores de IC₅₀ de entre 16,2 µg de proteína/ml y 37,7 µg de proteína/ml (**Tabla 5.3**). Igualmente, los resultados obtenidos mostraron que la AI-ECA era máxima y estable de las 48 a las 96 h de desarrollo de los cultivos en LDV. Por ello, se consideró que el desarrollo de las cepas recombinantes de *Enterococcus* spp. a 37°C durante 48 h era el apropiado para la producción de hidrolizados lácteos con una elevada AI-ECA. Sin embargo, aunque las cepas de *E. faecalis* DBH18 transformadas con pCG o pCGSP originaron grandes halos de actividad caseinolítica (**Fig. 5.2**), dichas cepas produjeron hidrolizados lácteos con una AI-ECA menor que los generados por la cepa control de *E. faecalis* DBH18 (pMG36c) (**Tabla 5.3**). Esto podría deberse a la hidrólisis de los péptidos de mayor tamaño en otros de menor tamaño sin AI-ECA o con una menor AI-ECA, debido a la sobreproducción de la GelE.

8.3.4. Identificación de los fragmentos peptídicos mayoritarios y de péptidos inhibidores de la ECA (PI-ECAs) en los hidrolizados lácteos de las cepas recombinantes de *Enterococcus* spp., desarrolladas en leche desnatada de vaca (LDV)

El análisis de los hidrolizados lácteos resultantes del desarrollo de las cepas recombinantes de *Enterococcus* spp. en LDV permitió, en primer lugar, la determinación de sus perfiles peptídicos a las 0, 24, 48 y 94 h de su desarrollo. Mientras los perfiles peptídicos generados por *E. faecalis* P36 (pCG) y *E. faecalis* (pCGSP) se muestran en la **figura 5.3.**, la existencia de dicha actividad hidrolítica no se observó en las muestras de *E. faecalis* P36 (pCSP) y *E. faecalis* (pMG36c) (resultados no mostrados). Por otra parte, la similitud de los perfiles peptídicos de los hidrolizados lácteos generados por *E. faecalis* P36 (pCG) y *E. faecalis* P36 (pCGSP) sugiere que la hidrólisis de las caseínas bovinas no parece afectarse por la coexpresión de *gelE* y *sprE*. Del mismo modo, la ausencia de variaciones significativas en los perfiles peptídicos de los hidrolizados lácteos durante el desarrollo de los cultivos en LDV sugiere que la mayor parte de la liberación de péptidos ocurre durante las primeras 24 h de desarrollo de *E. faecalis* P36, transformada con pCG o pCGSP, en LDV.

Asimismo, el análisis por RP-HPLC-MS/MS de los hidrolizados lácteos generados por las cepas recombinantes de *E. faecalis* P36, *E. faecalis* JH2-2, *E. faecium* AR24, *E. hirae* AR14, y *E. faecalis* DBH18 permitió la identificación de 38 péptidos mayoritarios incluyendo péptidos con AI-ECA y antioxidante. Algunos péptidos mayoritarios como los péptidos LQDKIHP [*f*(47-51)], FPGIPN [*f*(82-87)], VVPPF [*f*(99-103)], LHLPLP [*f*(133-138)], LHLPLPL [*f*(133-139)], IQAF [*f*(187-190)], VLGPVRGPF [*f*(197-206)], VRGPF [*f*(201-206)] y VRGPFPIIV [*f*(201-209)] procedían de la β-CN bovina, mientras otros como el péptido LKKYKVPQ [*f*(101-108)]

procedían de la α_{s1} -CN bovina (**Tabla 5.4**). Todos los péptidos mayoritarios identificados se detectaron previamente en los hidrolizados lácteos de cepas de *E. faecalis* de origen alimentario, ambiental y clínico y todos poseen una AI-ECA previamente descrita o comparten, al menos, tres residuos aminoacídicos de su región C-terminal con otros péptidos con AI-ECA conocida (Smacchi y Gobetti, 2000; Gómez-Ruiz y col., 2002; Robert y col., 2004; Quirós y col., 2005; Contreras y col., 2009). De gran interés es la identificación en los hidrolizados lácteos del péptido LHLPLP resistente a proteasas gastrointestinales, inhibidor competitivo de la ECA y con una potente actividad antihipertensiva *in vivo* en ratas espontáneamente hipertensas (Miguel y col., 2006; Quirós y col., 2009). Por otra parte, el péptido VLPVPQK [β -caseína, f(170-176)] con actividad antioxidante, fue otro de los péptidos identificados en la mayoría de los hidrolizados lácteos producidos por *E. faecalis* (**Tabla 5.4**). Por otra parte, como se ha descrito previamente en otras secciones de esta memoria la las diferencias observadas en los perfiles peptídicos de los hidrolizados lácteos pueden deberse a las complejas interacciones entre el desarrollo de los enterococos en el medio de cultivo, su actividad hidrolítica y la hidrólisis del sustrato (**sección 8.1.1**). En este contexto, péptidos derivados de la β -CN bovina como los péptidos VVVPPF [f(82-87)], LHLPLP [f(133-138)] y LHLPLPL [f(133-139)] o de la α_{s1} -CN bovina como los péptidos RPKHP [f(1-5)], LRLKK [f(99-103)] y YKVPQ [f(104-108)] se identificaron en todos los hidrolizados lácteos analizados, mientras otros no se identificaron en todos los hidrolizados (**Tabla 5.4**). Es importante observar también que todos los hidrolizados lácteos producidos por *E. faecalis* DBH18 y las cepas recombinantes activas de *E. faecalis*, *E. faecium* y *E. hirae* contenían, al menos, los péptidos LHLPLP, LHLPLPL y VVVPPF inhibidores de la ECA y el péptido antioxidante VLPVPQK.

Igualmente, la mayoría de los sitios de corte de los fragmentos peptídicos procedentes de la β -CN y la α_{s1} -CN bovinas se localizaron en enlaces peptídicos con los aminoácidos hidrofóbicos leucina (L), isoleucina (I) o fenilalanina (F) (**Fig. 5.4**), como se describió previamente con la GelE de *E. faecalis* OG1-10 (Mäkinen y col., 1989). Sin embargo, no se identificaron fragmentos peptídicos derivados del lugar corte de enlaces peptídicos del tipo ácido glutámico (E)-Xaa, donde Xaa es cualquier aminoácido, lo que correspondería a la actividad proteolítica de la SprE (Kawalec y col., 2005). En consecuencia, el patrón de hidrólisis de la β -CN y la α_{s1} -CN bovinas, así como la masa molecular e identidad de los péptidos mayoritarios de los hidrolizados lácteos generados por las cepas recombinantes de *E. faecalis* P36, *E. faecalis* JH2-2, *E. faecium* AR24 y *E. hirae* AR14 durante su desarrollo en LDV (**Fig. 8.4**), sugieren que todos los péptidos mayoritarios liberados proceden de la actividad hidrolítica de la metaloendopeptidasa GelE de *E. faecalis* DBH18.

También se conoce que la GelE la producen aproximadamente el 60% de los aislados clínicos de *E. faecalis*, que el fenotipo GelE⁺ requiere la presencia de los genes *gelE* y *fsr* intactos, y que la pérdida del genotipo GelE⁺ generalmente se debe a una delección de 23.9 kb de los genes *fsrABC*, posiblemente adquirida por transferencia genética horizontal (Galloway-Peña y col., 2011; Teixeira y col., 2012). Sin embargo, en las cepas de *E. faecalis* con los genes *fsr* y *gelE* aparentemente intactos, el fenotipo GelE⁻ también parece estar ligado a la presencia de un codón sin sentido en la proteína FsrC que impide que los aislados que la poseen detecten la proteína sensora GBAP (Teixeira y col., 2012). No obstante, en ciertas cepas de *E. faecalis* y en

ausencia de un sistema *fsr* funcional la producción de GelE y SprE es todavía detectable pero en cantidades basales (Singh y col., 2005). Sin embargo, mientras la existencia de un sistema *Fsr* funcional y la producción de GelE incrementan la severidad de la infección por *E. faecalis* en modelos experimentales con animales, plantas y nematodos ninguno de los dos son imprescindibles para el desarrollo de la enfermedad (Galloway-Peña y col., 2011).

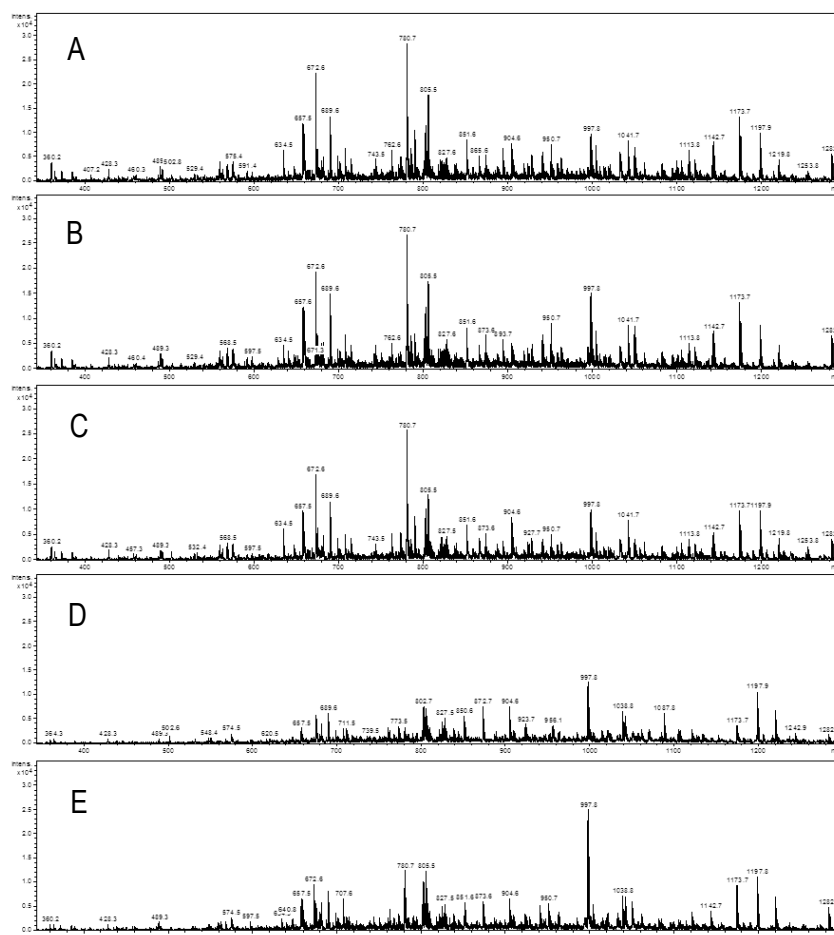


Fig. 8.4. Análisis por RP-HPLC-MS/MS (m/z 350-1300) de los hidrolizados lácteos generados por las cepas recombinantes de *E. faecalis* DBH18 (A), *E. faecalis* JH2-2 (pCG) (B), *E. faecalis* P36 (pCG) (C), *E. faecium* AR24 (pCG) (D) y *E. hirae* AR14 (pCG) (E) tras 48 h de desarrollo en leche desnatada de vaca (LDV).

Por ello, de lo previamente descrito y de los resultados de este trabajo investigador cabría considerar que las cepas de *E. faecalis*, productoras de GelE, podrían desempeñar un papel adicional, no asociado a la virulencia, en la producción de péptidos bioactivos con efectos potencialmente saludables. Asimismo, el reconocimiento derivado también de los resultados de este trabajo de que la GelE produce hidrolizados lácteos con AI-ECA, actividad antihipertensiva y actividad antioxidante confiere expectativas para el posible empleo de la GelE en la producción de éstos u otros péptidos bioactivos derivados de la hidrólisis de otros sustratos alimentarios. Finalmente, las cepas recombinantes de *Enterococcus* spp. productoras de GelE merecerían evaluarse para su empleo como productoras de péptidos bioactivos o como probióticos en futuras aplicaciones farmacéuticas, médicas y veterinarias.

8.4. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE PROTEASAS POR BACTERIAS LÁCTICAS (BAL) Y LEVADURAS: *Lactobacillus casei* CECT475 (pCG), QUE EXPRESA LA GELATINASA (GelE) DE *E. faecalis* DBH18, LIBERA PÉPTIDOS INHIBIDORES DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE LA ANGIOTENSINA (ECA) DURANTE SU DESARROLLO EN LECHE DESNATADA DE VACA

RESUMEN

La transformación de BAL de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Streptococcus* con los plásmidos recombinantes pCG (*gelE*), que codifica la gelatinasa (GelE) o pCGSP (*gelE-SprE*) que codifica la GelE y serina proteasa (SprE), dos proteasas extracelulares producidas por *E. faecalis* DBH18, permitió la selección de cepas recombinantes de *L. lactis* subesp. *lactis* IL1403, *L. lactis* subesp. *cremoris* NZ9000 y *Lactobacillus casei* CECT475 con actividad caseinolítica. Asimismo, el desarrollo de *Lb. casei* CECT475 (pCG) y *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) en leche desnatada de vaca (LDV) permitió la obtención de hidrolizados lácteos con una elevada AI-ECA. El análisis de los hidrolizados lácteos por RP-HPLC-MS/MS (del inglés, *Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*) reveló la presencia en dichos hidrolizados de péptidos previamente descritos con AI-ECA, actividad antihipertensiva y actividad antioxidante. Por otra parte, la obtención de anticuerpos policlonales de actividad predeterminada frente al péptido antihipertensivo LHLPLP y el desarrollo de un ELISA competitivo indirecto (ELISA-CI) permitió la detección y cuantificación del péptido LHLPLP en los hidrolizados lácteos de interés. Además, la clonación de insertos del gen *gelE* de *E. faecalis* DBH18 responsables de la síntesis de la proenzima GelE (GE) y la GelE madura (MGE) en los vectores de expresión proteica pPICZαA y pKLAC2 generó los plásmidos recombinantes pPICGE (GE), pPICMGE (MGE) y pKLGE (GE) que, a continuación, se linearizaron y transfirieron por transformación a células competentes de *Pichia pastoris* X-33 y *Kluyveromyces lactis* GG799. Sin embargo, ninguna de las cepas recombinantes de *P. pastoris* X-33GE (GE), *P. pastoris* X-33MG (MGE) y *K. lactis* GG799GE (GE) mostraron actividad extracelular caseinolítica o proteolítica.

8.4.1. Actividad caseinolítica, desarrollo de las bacterias lácticas (BAL) recombinantes en leche desnatada de vaca (LDV) y determinación de la actividad inhibidora de la ECA de los hidrolizados lácteos resultantes

Resultados previamente descritos en esta memoria demuestran que cepas recombinantes de *Enterococcus* spp., transformadas con vectores de expresión que codifican las proteasas GelE y GelE/SprE de *E. faecalis* DBH18 pero no la SprE únicamente, producen hidrolizados lácteos con elevada AI-ECA, actividad antihipertensiva y actividad antioxidante durante su desarrollo en leche desnatada de vaca (LDV) (**sección 8.3**). Sin embargo, ya que los enterococos pueden codificar o adquirir factores potenciales de virulencia y de resistencia a antibióticos y, además, se consideran agentes responsables de infecciones nosocomiales (Willems y col., 2011), de gran interés científico y aplicado sería la posible producción heteróloga de las proteasas GelE y GelE/SprE, producidas por *E. faecalis* DBH18, por otras bacterias lácticas (BAL) u otros hospedadores microbianos más seguros. En este contexto, las BAL recombinantes productoras

de proteasas permitirían la producción de péptidos bioactivos con AI-ECA durante su desarrollo en LDV u otros sustratos alimentarios, mientras la capacidad de las levaduras de secretar al medio extracelular elevadas cantidades de péptidos y proteínas podrían facilitar la producción industrial de proteasas de interés biotecnológico como la GelE.

En este trabajo la transformación de BAL de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Streptococcus* con los plásmidos pCG (*gelE*) o pCGSP (*gelE-sprE*) permitió la identificación de cepas recombinantes de *L. lactis* subesp. *lactis* IL1403, *L. lactis* subesp. *cremoris* NZ9000 y *Lb. casei* CECT475 con actividad caseinolítica (**Fig. 6.1**). La producción heteróloga y expresión funcional de la GelE por *L. lactis* NZ9800 se había descrito previamente (Waters y col., 2003) lo que, sugirió, que su producción por otras BAL podría resultar relativamente fácil. Sin embargo, los resultados de este trabajo investigador denotan una baja frecuencia de obtención de BAL recombinantes con actividad caseinolítica, lo que podría deberse a: (a) el empleo de BAL poco competentes o de condiciones de transformación inadecuadas; (b) el reconocimiento poco eficaz del péptido señal de la GelE y GelE/SprE por las peptidasas señal de los hospedadores heterólogos lo que podría afectar a su procesamiento, transporte y secreción; y (c) la toxicidad de las proteasas potencialmente producidas para las BAL transformadas. También se han descrito otros intentos fallidos de producir la GelE mediante su expresión por *E. coli* (Collin y Olsen, 2000; Waters y col., 2003; Hancock y Perego, 2004).

De los resultados obtenidos de este trabajo se deduce que, como se esperaba, las BAL transformadas con el plásmido control pMG36c no produjeron una actividad hidrolítica detectable. Por otra parte, a pesar de que las células recombinantes de *L. lactis* mostraron actividad caseinolítica la pérdida espontánea de la capacidad hidrolítica por *L. lactis* subesp. *lactis* IL1403 (pCGSP) así como el descenso inusualmente lento del pH durante el desarrollo de *L. lactis* NZ9000 (pMG36c) y *L. lactis* NZ9000 (pCG) en LDV, forzaron la decisión de retirar dichas cepas de experiencias relacionadas con su evaluación como factorías celulares de producción y expresión funcional de las proteasas clonadas. Además, ya que la actividad caseinolítica de las cepas recombinantes de *Lb. casei* CECT475 (pCG) y *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) fue mucho mayor que la de las cepas recombinantes de *L. lactis*, las cepas recombinantes de *Lb. casei* CECT475 fueron las seleccionadas para una mejor caracterización de la producción de las proteasas recombinantes.

Para ello, *Lb. casei* CECT475 (pMG36c), *Lb. casei* CECT475 (pCG) y *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) se incubaron en LDV a 33, 37 y 40°C y su desarrollo se monitorizó mediante la determinación del pH y la AI-ECA de los cultivos. Todas las cepas recombinantes de *Lb. casei* CECT475 redujeron el pH de la LDV por debajo de 4,5 aunque se observaron diferencias en función de la temperatura de incubación y de la cepa recombinante (**Fig. 6.2**). Por su parte, el porcentaje de inhibición de la ECA de los hidrolizados lácteos resultantes dependió de la temperatura y del tiempo de desarrollo. Así, a pesar de que se detectó un acusado descenso del pH durante el desarrollo de las cepas recombinantes de *Lb. casei* CECT475 a 40°C, la producción de hidrolizados lácteos con una elevada AI-ECA (porcentaje de inhibición de la ECA > 86,9%) tuvo lugar durante el desarrollo de *Lb. casei* CECT475 (pCG) y *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) a 37°C (**Fig. 6.2b**). Asimismo, la determinación de la AI-ECA (expresada como IC₅₀) de

los hidrolizados lácteos generados por *Lb. casei* CECT475 (pMG36c), *Lb. casei* CECT475 (pCG) y *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) durante su desarrollo en LDV a 37°C durante 12, 24 y 48 h, permitió observar que mientras en los hidrolizados lácteos de *Lb. casei* CECT475 (pMG36c) no mostraron AI-ECA los hidrolizados producidos por *Lb. casei* CECT475 (pCG) y *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) mostraron una elevada AI-ECA con valores IC_{50} que oscilaron entre $53,1 \pm 6,1$ y $13,1 \pm 0,7$ μ g de proteína/ml (**Tabla 6.2**). Conviene también resaltar que los valores IC_{50} de los hidrolizados lácteos, derivados del desarrollo de las cepas recombinantes de *Lb. casei* CECT475 en LDV, son similares a los producidos por las cepas de *E. faecalis* de origen alimentario, ambiental y clínico y a los producidos por las cepas recombinantes de *Enterococcus* spp. que expresan la GelE o GelE/SprE (Muguerza y col., 2006) (**sección 8.1.1**; **sección 8.3.3**).

También conviene conocer que cepas de *Lb. casei* evaluadas como probióticos manifiestan AI-ECA y actividad antitrombótica aunque su actividad depende de las cepas, sustratos alimentarios y condiciones de la fermentación (Rojas-Ronquillo y col., 2012). También se sabe que las cepas de *Lb. casei* Shirota (Yakult) y *Lb. casei* Immunitas (Danone) utilizadas como componentes probióticos de alimentos funcionales poseen efectos beneficiosos para la salud y que *Lb. casei* BL23 posee propiedades inmunomoduladoras y probióticas (Rochat y col., 2007; Vasiljevic y Shah, 2008). La cepa de *Lb. casei* CECT475 también se ha evaluado, en combinación con el uso de fibra de naranja, para la producción de leche fermentada como ingredientes probióticos y para la elaboración de embutidos crudos curados como probióticos y para la mejora de su calidad higiénica (Sayes-Barberá y col., 2012). En consecuencia, la capacidad de las células recombinantes de *Lb. casei* CECT475 de generar hidrolizados lácteos con una elevada AI-ECA es un resultado muy interesante y una característica relevante, que debería evaluarse con otras cepas de *Lb. casei* y otras BAL de interés.

8.4.2. Determinación de los perfiles peptídicos e identificación de los fragmentos peptídicos mayoritarios de los hidrolizados lácteos derivados del desarrollo de *Lb. casei* CECT475 (pCG) y *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) en leche desnatada de vaca (LDV)

El análisis por RP-HPLC-MS/MS del perfil peptídico de los hidrolizados lácteos derivados del desarrollo de *Lb. casei* CECT475 (pCG) y *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) en LDV a 37°C, reveló la presencia de un gran número de fragmentos peptídicos (**Fig. 6.3**). Los hidrolizados lácteos producidos por las cepas recombinantes de *Lb. casei* CECT475 mostraron perfiles peptídicos similares, aunque los hidrolizados lácteos producidos por *Lb. casei* CECT475 (pCG) tras 24 y 48 h de desarrollo en LDV contenían fragmentos peptídicos con una absorbancia ligeramente superior. Asimismo, el análisis por RP-HPLC-MS/MS de los hidrolizados lácteos permitió la identificación de 24 fragmentos peptídicos mayoritarios, de los que 21 procedían de la β -CN bovina y 3 de la α_{s2} -CN bovina (**Tabla 6.3**) incluyendo péptidos con AI-ECA, antihipertensiva y antioxidante. En este contexto, algunos de los péptidos identificados derivados de la β -CN bovina como los péptidos LQDKIHP [$f(47-51)$], LTQTPVVPPF [$f(77-87)$], VVVPPF [$f(99-103)$], LHLPLP [$f(133-138)$], LHLPLPL [$f(133-139)$], VLGPRGPFPIIV [$f(197-209)$] y VRGPFPIIV [$f(201-209)$] se conoce que poseen AI-ECA o comparten, al menos tres, residuos aminoácidos de su región C-terminal con otros péptidos con AI-ECA previamente descrita (Gómez-Ruiz y col., 2002; Miguel y col., 2006; Quirós y col., 2007) (**sección 8.1.1**; **sección 8.3.4**). Asimismo, la mayoría de los PI-

ECAs identificados son ricos en el aminoácido prolina (P), uno de los aminoácidos que más favorecen la unión del péptido al centro activo de la ECA. Además, es interesante observar que el péptido antihipertensivo LHLPLP y el péptido VLPVPQK con actividad antioxidante se identificaron en todos los hidrolizados lácteos evaluados (**Tabla 6.3**).

Como se ha descrito en otras secciones de esta memoria la fragmentación de las caseínas bovinas con un patrón de corte que implica enlaces peptídicos con un residuo aminoacídico hidrofóbico, así como la identidad de los péptidos mayoritarios de los hidrolizados lácteos producidos por *Lb. casei* CECT475 (pCG) y *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) serían el resultado de la actividad hidrolítica de la GelE de *E. faecalis* DBH18. Por el contrario, no parece que la SprE se encuentre involucrada en la producción de PI-ECAs ya que no se identifican fragmentos peptídicos adicionales a los identificados procedentes de la actividad de la GelE, al menos en las condiciones experimentales de los ensayos realizados.

8.4.3. Detección y cuantificación del péptido antihipertensivo LHLPLP producido por las cepas recombinantes de *Lb. casei* CECT475

A diferencia de la mayoría de los estudios en los que la producción y cuantificación de PI-ECAs se determina por técnicas cromatográficas o espectrométricas, durante la realización de este trabajo se ha procedido a generar anticuerpos policlonales de especificidad predeterminada y al desarrollo y puesta a punto de un ELISA-CI (**Fig. 8.5**) para detectar y cuantificar el péptido antihipertensivo LHLPLP en las muestras con fragmentos peptídicos de <3 KDa, obtenidas por filtración de los hidrolizados lácteos producidos por *Lb. casei* CECT475 (pCG) y *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) durante su desarrollo en LDV (**Tabla 6.4**).

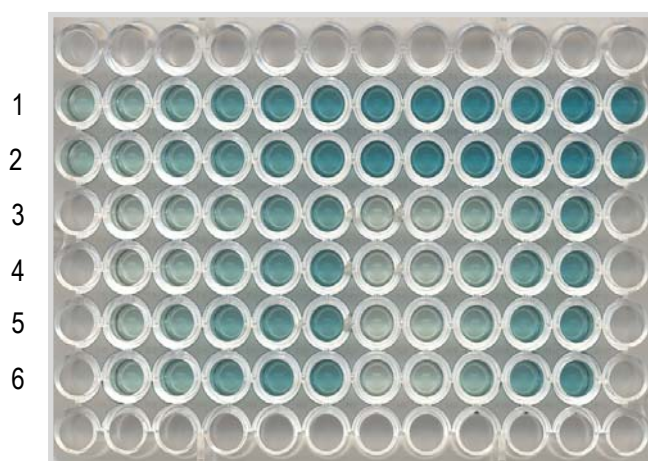


Figura 8.5. Resultado de una prueba de ELISA-CI para la identificación y cuantificación del péptido antihipertensivo LHLPLP. En las filas 1 y 2 se depositan concentraciones conocidas decrecientes del péptido sintético LHLPLP. En las filas 3, 4 y 5, 6 se muestran diluciones decrecientes, por duplicado, de las muestras problema correspondientes a las fracciones de <3 KDa de los hidrolizados lácteos de interés. A mayor intensidad de color menor concentración del péptido LHLPLP.

La especificidad de los anticuerpos policlonales de conejo para reconocer el péptido antihipertensivo LHLPLP se evaluó mediante un ELISA-NCI frente a la β -CN bovina purificada, LDV y κ -CN bovina purificada. Los anticuerpos anti-LHLPLP mostraron una elevada reactividad inmunoquímica frente a la β -CN bovina y la LDV, pero una baja o nula reactividad frente a la κ -CN bovina (**Fig.4A**). Sin embargo, la especificidad de los anticuerpos policlonales de conejo frente al péptido LHLPLP se evaluó mediante un ELISA-CI. Para ello, los pocillos de las placas de ensayo se tapizaron con la β -CN bovina purificada para que los péptidos LHLPLP (β -CN [f(133-138)]) o LHLPLPL (β -CN [f(133-139)]) compitieran con los epítopos LHLPLP de la β -CN bovina para unirse a los anticuerpos anti-LHLPLP. De los resultados de la **Fig. 6.4B** se deduce que el péptido LHLPLPL no compitió de manera efectiva con la β -CN bovina mientras que la cantidad de péptido LHLPLP requerido para inhibir en un 50% la unión de la β -CN a los anticuerpos anti-PL-KLH fue de, aproximadamente, 5 μ g/ml. Además, el ELISA-CI desarrollado permitió la detección y cuantificación del péptido LHLPLP en concentraciones de hasta 0,1 μ g/ml. Por ello, el método de ELISA desarrollado en este trabajo constituye una alternativa sensible, rápida y económica a otras técnicas cromatográficas y espectrométricas de detección y cuantificación de péptidos bioactivos (Quirós y col., 2006). Por otra parte, la determinación de la correlación entre la cantidad de LHLPLP y la AI-ECA de los hidrolizados lácteos producidos por *Lb. casei* CECT475 (pCG) y *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) reveló que un aumento de la cantidad de LHLPLP de las muestras conducía a un incremento de su AI-ECA, aunque no fue posible determinar una correlación lineal entre ambas. Es posible que las fluctuaciones en la AI-ECA de los hidrolizados lácteos con fragmentos peptídicos de <3 KDa se deban a la pérdida de péptidos de masas moleculares mayores y con una AI-ECA sinérgica con los de menor tamaño.

8.4.4. Actividad caseinolítica y proteolítica de las levaduras recombinantes *P. pastoris* X-33GE, *P. pastoris* X-33MGE y *K. lactis* GG799GE

La amplificación, a partir del ADN genómico purificado de *E. faecalis* DBH18 de *gelE* sin la secuencia nucleotídica del péptido señal de la GelE (fragmento GE) y de *gelE* sin la secuencia nucleotídica del péptido señal ni la prosequencia aminoacídica de la GelE (fragmento MGE) y, su posterior clonación en los vectores de expresión pPICZ α A y pKLAC2, permitió la obtención de las levaduras recombinantes *P. pastoris* X-33GE (GE), *P. pastoris* X-33MGE (MGE) y *K. lactis* GG799GE (GE). Sin embargo, cuando las cepas recombinantes derivadas de *P. pastoris* X-33 se sembraron en placas de BMMY con metanol y LDV y las cepas recombinantes de *K. lactis* GG799 se sembraron en placas de YPGal con LDV, ninguna de las colonias desarrolladas mostró actividad caseinolítica. Asimismo, cuando la posible actividad proteolítica de los sobrenadantes libres de células de las levaduras recombinantes se evaluó frente al sustrato HPA (del inglés, *Hide Powder Azure*) ninguno de los sobrenadantes incrementó la absorbancia de las muestras como resultado de la liberación de péptidos solubles liberados del sustrato HPA. La ausencia del fenotipo GelE⁺ en las levaduras recombinantes podría depender del inserto, del vector de expresión y de la levadura seleccionada (Cereghino y col., 2000; Borrero y col., 2012). En este contexto, un funcionamiento inadecuado de los promotores, de la señal de terminación de la traducción, de las peptidasas que reconocen el sitio de corte, procesamiento y transporte de la GelE o la descoordinación entre la síntesis de la enzima y su plegamiento (Böer y col., 2007; Idiris y col., 2010; Borrero y col., 2012), podrían justificar la ausencia de actividad

caseinolítica o proteolítica en los sobrenadantes de las levaduras recombinantes. Otros obstáculos que podrían afectar la correcta expresión de la GelE por las levaduras recombinantes podrían ser la incapacidad de la GelE de alcanzar su conformación activa o la presencia de modificaciones postraduccionales (PTMs) que anulen o disminuyan significativamente su actividad proteolítica (Gasser y col., 2008; Zhao y Jensen, 2009).

Sin embargo, la obtención de cepas recombinantes de *Lb. casei* CECT475 que expresan la GelE de *E. faecalis* DBH18 ha permitido la obtención de hidrolizados lácteos con elevada AI-ECA debido a la presencia de péptidos con AI-ECA, antihipertensiva y antioxidante. Asimismo, la obtención de anticuerpos policlonales específicos anti-LHLPLP y el desarrollo de un ELISA-CI han permitido la cuantificación del péptido LHLPLP, con una elevada AI-ECA y actividad antihipertensiva en los hidrolizados lácteos derivados del desarrollo de las cepas recombinantes de *Lb. casei* CECT475 en LDV. El que el péptido LHLPLP sea resistente a una digestión gastrointestinal simulada, reduzca acusadamente la presión arterial sistólica y diastólica de ratas espontáneamente hipertensas (Quirós y col., 2007; 2009) y se cuantifique con facilidad en los hidrolizados lácteos filtrados de <3 KDa de tamaño molecular, sugiere que los hidrolizados lácteos filtrados o las fracciones purificadas enriquecidas con el péptido LHLPLP podrían resultar atractivos como ingredientes alimentarios antihipertensivos. Finalmente, otras BAL con propiedades funcionales reconocidas además de productoras heterólogas de la GelE o la utilización de la GelE, parcialmente purificada o purificada a homogeneidad, deberían evaluarse por su interés para la liberación de PI-ECAs u otros péptidos bioactivos de carnes, huevos, pescados, vegetales y otros sustratos alimentarios de interés.

8.5. LA GELATINASA (GelE) PURIFICADA PRODUCE PÉPTIDOS INHIBIDORES DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE LA ANGIOTENSINA (ECA) POR HIDRÓLISIS DE LA LECHE DESNATADA DE VACA

RESUMEN

La gelatinasa (GelE), una metaloendopeptidasa producida por *E. faecalis* se purificó de *E. faecalis* DBH18 una cepa natural productora de GelE y de *Lb. casei* CECT475 (pCG) una cepa recombinante productora de GelE. El incremento de la actividad proteolítica específica y la recuperación de la GelE inicial fue mayor en la GelE purificada de *E. faecalis* DBH18 que en la purificada de *Lb. casei* CECT475 (pCG). La hidrólisis de leche desnatada de vaca (LDV) por fermentación con *E. faecalis* DBH18 o *Lb. casei* CECT475 (pCG) así como por la hidrólisis enzimática con la GelE purificada de ambas bacterias productoras originó hidrolizados lácteos de elevada AI-ECA. Sin embargo, la GelE purificada precisó de tiempos de incubación más cortos que los cultivos microbianos para la producción de hidrolizados lácteos con elevada AI-ECA. El análisis por MALDI-TOF/MS (del inglés, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization coupled to Time of Flight Mass Spectrometry*) de los hidrolizados lácteos, fermentados con *E. faecalis* DBH18 o *Lb. casei* CECT475 (pCG) o hidrolizados con la GelE purificada a homogeneidad, permitió la identificación de péptidos con AI-ECA y actividad antihipertensiva, previamente descritos. Los hidrolizados lácteos derivados de la hidrólisis de LDV con la GelE purificada de *E. faecalis* DBH18 mostraron la mayor AI-ECA y acumulación del péptido antihipertensivo LHLPLP.

8.5.1. Desarrollo en diversos medios de cultivo y determinación de la actividad proteolítica de *E. faecalis* DBH18 y *Lb. casei* CECT475 (pCG)

Para optimizar el desarrollo y la actividad proteolítica extracelular de *E. faecalis* DBH18 una cepa productora natural de GelE (Sánchez y col., 2007) y de *Lb. casei* CECT475 (pCG) una cepa recombinante en la que el promotor constitutivo P₃₂ del vector pCG (*gelE*) permite una producción constante y constitutiva de la GelE (**sección 8.3.2**), en este trabajo se evaluaron tres medios de cultivo diferentes MRS, GM17 y TH. De los resultados obtenidos, se deduce que tanto el desarrollo de los cultivos como su actividad proteolítica resultaron influidos por la cepa, el medio de cultivo y el tiempo de incubación evaluados (**Fig. 7.1**). Las diferencias observadas en la actividad proteolítica de los cultivos sugieren que las fuentes de nitrógeno de los cultivos como el extracto de levadura, la peptona o la triptona modulan la biosíntesis de proteínas como se describe durante la evaluación de la actividad proteolítica de proteinasas asociadas a la pared celular (PPC) de algunos lactobacilos aunque, por otra parte, también podrían constituir el reflejo de diferencias metabólicas entre las cepas productoras de GelE (Hebert y col., 2002; Hebert y col., 2008). Diversos estudios han determinado que la actividad proteolítica de BAL desarrolladas en un medio rico en péptidos, como el MRS, es baja si se compara con la de aquellas desarrolladas en un medio sintético menos enriquecido (Hebert y col., 2008; Sadat-Mekmene y col., 2011). En este estudio, el mejor desarrollo y la mayor actividad proteolítica de los cultivos se obtuvieron tras 8 h de desarrollo de *E. faecalis* DBH18 en el medio GM17 y de *Lb. casei* CECT475 (pCG) en el medio MRS, ambos a 37°C (**Fig. 7.1**).

8.5.2. Purificación de la GelE y análisis de las fracciones purificadas por MALDI-TOF/MS

La GelE es una metaloendopeptidasa producida por *E. faecalis* que se sabe contribuye a la formación de películas superficiales, biopelículas o *biofilms*, a la evasión del sistema inmune y a la virulencia de los enterococos por la degradación de numerosos sustratos proteicos (Waters y col., 2003; Park y col., 2007; Park y col., 2008; Steck y col., 2011). Sin embargo, la GelE también puede jugar un papel, no asociado a la virulencia, en la biología de *E. faecalis* (Teixeira y col., 2012). Igualmente, de los resultados presentados en este trabajo se sabe que la mayoría, pero no todas, las cepas de *E. faecalis* de origen alimentario, ambiental y clínico producen hidrolizados lácteos con elevada AI-ECA debido a la producción de PI-ECAs (**sección 8.1**), mientras que la expresión de la GelE por cepas recombinantes de *Enterococcus* spp. y *Lb. casei* CECT475 origina la liberación de PI-ECAs y otros péptidos bioactivos, durante su desarrollo en LDV (**sección 8.3; sección 8.4**). Sin embargo, la síntesis de factores potenciales de virulencia por las cepas de *E. faecalis* y *Enterococcus* spp. productoras de GelE aconsejan el desarrollo y empleo de sistemas microbianos, alternativos y más seguros, que permitan la producción biotecnológica de la GelE. Por ello, durante la realización de este trabajo se han obtenido BAL más seguras que permiten la producción y expresión funcional de la GelE aunque su producción y expresión funcional por levaduras recombinantes no ha sido, todavía, posible (**sección 8.4**). Sin embargo, otro enfoque experimental que permita la producción de péptidos bioactivos incluyendo la de péptidos con actividad antihipertensiva a partir de sustratos alimentarios, sería la de acometer la hidrólisis enzimática de dichos sustratos por la GelE, parcialmente purificada o purificada a homogeneidad.

Por ello, tras la determinación experimental de que los medios de cultivo más eficaces para el desarrollo y actividad proteolítica de *E. faecalis* DBH18 y *Lb. casei* CECT475 (pCG) eran los medios GM17 y MRS, respectivamente, sus sobrenadantes libres de células se sometieron a una precipitación de las proteínas con sulfato amónico, a una separación cromatográfica de las proteínas por matrices de interacción hidrofóbica (CIH) y a la diálisis y concentración de las fracciones con mayor actividad proteolítica durante su purificación por CIH. Sin embargo, de los resultados obtenidos se observan diferencias en la actividad caseinolítica y proteolítica de las fracciones purificadas a partir de *E. faecalis* DBH18 y *Lb. casei* CECT475 (pCG). Lo más destacable es que la actividad caseinolítica de las fracciones purificadas de *E. faecalis* DBH18 aumentó notablemente durante su purificación mientras que en las fracciones purificadas de *Lb. casei* CECT475 (pCG) disminuyó, sobre todo, tras su purificación por CIH (**Fig. 7.2**). Igualmente, la purificación de la GelE producida por *E. faecalis* DBH18 permitió un incremento de 873 veces su actividad proteolítica específica con una recuperación del 2,6% de la actividad proteolítica inicial, mientras la purificación de la GelE producida por *Lb. casei* CECT475 (pCG) permitió un incremento de 31 veces su actividad proteolítica específica y una recuperación de la actividad proteolítica inicial del 0,3% (**Tabla 7.1**). De los resultados obtenidos se deduce que es posible que componentes todavía desconocidos del medio GM17 interfieran con la actividad proteolítica de la GelE producida por *E. faecalis* DBH18 durante su precipitación con sulfato amónico, mientras otros componentes también desconocidos parecen reducir la adsorción o elución de la GelE producida por *Lb. casei* CECT475 (pCG) durante su purificación por la matriz de interacción hidrofóbica.

Asimismo, para determinar la pureza de la GelE dializada y concentrada producida por *E. faecalis* DBH18 y *Lb. casei* CECT475 (pCG) las muestras purificadas se sometieron a análisis por SDS-PAGE (del inglés, *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), lo que permitió la visualización en las muestras de bandas proteicas con una masa molecular similar a la de la GelE madura y de la GelE madura sin el procesamiento aminoacídico C-terminal (Del Papa y col., 2007), así como de otras bandas proteicas de menor tamaño que la GelE madura (**Fig. 7.3**). Por ello, para determinar con precisión el origen y naturaleza de las bandas proteicas observadas por SDS-PAGE las muestras dializadas y concentradas se sometieron a digestión en gel con tripsina y al análisis de los fragmentos peptídicos generados por Espectrometría de Masas (MS) mediante Desorción/Ionización de la Matriz mediante Láser (MALDI) con acoplamiento a un detector de Tiempo de Vuelo (MALDI-TOF/MS). De los fragmentos peptídicos generados, 17 de ellos poseían el tamaño molecular y secuencia aminoacídica de péptidos encriptados en la GelE producida por *E. faecalis* DBH18 y cubrían 203 de los 318 aminoácidos de la secuencia madura de la GelE, lo que supone una cobertura del 63,8% del total de la secuencia (**Fig. 7.4**). Por otra parte, dos de los péptidos identificados NSFQVT (f[200-205]) y FNSAGIGAK (f[485-493]) proceden de lugares de corte previo a un aminoácido hidrofóbico, lo que puede resultar de la actividad hidrolítica de la GelE purificada (Mäkinen y col., 1989). Otros fragmentos peptídicos detectados, no encriptados en la GelE, se identificaron como péptidos derivados de la queratina una contaminación frecuente en el análisis por MALDI-TOF de muestras con baja concentración de analito. Por otra parte, el que ninguno de los péptidos identificados perteneciese a la secuencia del péptido señal o a la prosequencia de la GelE, confirmó que la GelE madura era correctamente procesada y liberada al medio extracelular por la cepa natural *E. faecalis* DBH18 y la recombinante *Lb. casei* CECT475 (pCG). Sin embargo, las diferencias en la actividad proteolítica de la GelE purificada de ambas cepas podrían deberse a diferencias en sus características conformacionales o a otros eventos moleculares todavía desconocidos. En consecuencia, según el esquema de purificación utilizado en este trabajo *E. faecalis* DBH18, desarrollado en GM17, produce una GelE con mejores características que la GelE producida por *Lb. casei* CECT475 (pCG). No obstante, convendría realizar esfuerzos adicionales encaminados a la purificación de la GelE por otros microorganismos, recombinantes o no, desarrollados en diversos medios de cultivo y con mejores rendimientos de recuperación de la GelE inicial y una mayor actividad proteolítica específica.

8.5.3. Actividad inhibidora de la ECA de hidrolizados lácteos derivados de leche desnatada de vaca (LDV)

La fermentación de la LDV con *E. faecalis* DBH18, *Lb. casei* CECT475 (pCG) o *Lb. casei* CECT475 (pMG36c) así como la hidrólisis enzimática de la LDV con sus sobrenadantes libres de células, con las fracciones purificadas resultantes de la precipitación de sus sobrenadantes con sulfato amónico o con la GelE dializada y concentrada tras su purificación por cromatografía de interacción hidrofóbica (CIH), originó hidrolizados lácteos con una elevada AI-ECA a excepción de las muestras de LDV fermentadas con *Lb. casei* CECT475 (pMG36c) (**Tabla 7.2**). Todos los hidrolizados lácteos mostraron una elevada AI-ECA expresada como valores de IC₅₀ de 6,5 µg de proteína/ml a 73,6 µg de proteína/ml y dentro del rango de valores descritos para otros hidrolizados proteicos con elevada AI-ECA (Gobbetti y col., 2000; Gómez Ruíz y col., 2002;

Muguerza y col., 2006; Miguel y col., 2009). Los valores de IC_{50} más bajos y, en consecuencia, los valores de AI-ECA más elevados correspondieron a las muestras de LDV digeridas durante 2 h con la GeIE purificada de *E. faecalis* DBH18. Valores de IC_{50} ligeramente superiores se observaron en los hidrolizados lácteos procedentes de la digestión de la LDV durante 4 a 6 h con la GeIE purificada de *E. faecalis* DBH18 o *Lb. casei* CECT475 (pCG). También se observó una elevada AI-ECA en los hidrolizados lácteos generados tras el desarrollo de *E. faecalis* DBH18 o *Lb. casei* CECT475 (pCG) durante 24 o 48 h en LDV. De los resultados descritos se deduce que la GeIE purificada requiere de tiempos de incubación mucho menores que los que exigen los cultivos microbianos para la producción de hidrolizados lácteos con una elevada AI-ECA. Además, los hidrolizados lácteos derivados de la hidrólisis de la LDV con la GeIE purificada mostraron una mayor AI-ECA que los hidrolizados de LDV obtenidos con enzimas gastrointestinales (Contreras y col., 2009) lo que confirma la eficiencia de las proteasas bacterianas en la liberación de PI-ECAs (Hernández-Ledesma y col., 2002; Otte y col., 2007). Asimismo, la GeIE purificada de *E. faecalis* DBH18 o *Lb. casei* CECT475 (pCG) originó hidrolizados lácteos con una AI-ECA similar o mayor que la producida por otras proteinasas purificadas de *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* (Guo y col., 2009), *Lactobacillus helveticus* PR4 (Minervini y col., 2003), *Aspergillus oryzae* (Tsai y col., 2008) o por una metaloproteinasa neutra producida por *Bacillus thermophilus* (Mäkinen y col., 1989; Hernández-Ledesma y col., 2002; Otte y col., 2007). Por último, la presencia de GeIE activa en los sobrenadantes libres de células originó una elevada AI-ECA en las muestras de LDV hidrolizadas con estas fracciones, aunque la AI-ECA fue menor que la detectada en la LDV hidrolizada con la GeIE purificada a homogeneidad (**Tabla 7.2**).

8.5.4. Determinación de los perfiles peptídicos e identificación de los fragmentos peptídicos mayoritarios presentes en los hidrolizados lácteos derivados de leche desnatada de vaca (LDV)

El análisis por MALDI-TOF/MS de los hidrolizados lácteos derivados de la LDV fermentada con *E. faecalis* DBH18, *Lb. casei* CECT475 (pCG) o *Lb. casei* CECT475 (pMG36c) y de la LDV sometida a hidrólisis enzimática con fracciones purificadas de la GeIE producida por ambas cepas, permitió la determinación de sus perfiles peptídicos. Dichos perfiles variaron sólo ligeramente de unas muestras a otras ya que, a pesar de su aparente heterogeneidad, una gran cantidad de fragmentos peptídicos con masas monoisotópicas idénticas se identificaron en todas las muestras analizadas. Así, el perfil peptídico del hidrolizado lácteo generado tras el desarrollo de *E. faecalis* DBH18 durante 48 h en LDV resultó casi idéntico al derivado de la LDV hidrolizada durante 2 h con la GeIE purificada de *E. faecalis* DBH18. Por otra parte, el análisis por MALDI-TOF/MS de los hidrolizados lácteos con una elevada AI-ECA permitió la identificación de 15 péptidos mayoritarios, de los que 13 procedían de la β -CN bovina y 2 de la α_{s1} -CN bovina. Algunos de los péptidos procedentes de la β -CN bovina como los péptidos VVPPF [*f*(82-87)], VSKVKET [*f*(95-101)], LHLPLP [*f*(133-138)], LHLPLPL [*f*(133-139)], VLGPRGPFPP [*f*(197-206)], VLGPRGPFPIIV [*f*(197-209)], VRGPFPP [*f*(201-206)] y VRGPFPIIV [*f*(201-209)] (**Tabla 7.3**) poseen una AI-ECA conocida o comparten, al menos, 3 residuos aminoácidos de su región C-terminal con otros péptidos con AI-ECA previamente descrita (Gómez-Ruiz y col., 2002; Miguel y col., 2006; Quirós y col., 2007). Además, los péptidos VRGPFPP, LHLPLP, LHLPLPL y

VLGPVRGPFPIIV se identificaron en todos los hidrolizados lácteos con elevada AI-ECA. Como se ha descrito en otras secciones de esta memoria (**sección 8.3.4**) de la secuencia aminoacídica de los péptidos identificados se deduce que las caseínas bovinas se hidrolizaron a partir de enlaces peptídicos con aminoácidos hidrofóbicos como la leucina (L), isoleucina (I), fenilalanina (P) o valina (V) lo que coincide con la actividad y especificidad previamente descritas de la GeIE (Mäkinen y col., 1989).

8.5.5. Detección y cuantificación del péptido antihipertensivo LHLPLP en los hidrolizados lácteos derivados de la digestión de la LDV con la GeIE purificada de *E. faecalis* DBH18 o *Lb. casei* CECT475 (pCG)

El empleo de anticuerpos policlonales de actividad predeterminada y de un ELISA-CI permitió la detección y cuantificación del péptido antihipertensivo LHLPLP en las muestras con fragmentos peptídicos de >3 KDa, obtenidas por filtración de hidrolizados lácteos derivados de la digestión de LDV con la GeIE purificada de *E. faecalis* DBH18 o *Lb. casei* CECT475 (pCG) (**Tabla 7.4**). Como se ha descrito en otras secciones de esta memoria (**sección 8.4.3**), este método de cuantificación del péptido antihipertensivo LHLPLP supone una alternativa rápida y eficaz a otras técnicas analíticas incluidas las cromatográficas y espectrométricas (Quirós y col., 2006). De los resultados obtenidos en este trabajo se deduce que el péptido LHLPLP se identifica y acumula en todos los hidrolizados lácteos derivados de la LDV aunque en cantidades ligeramente superiores en los hidrolizados lácteos procedentes de la hidrólisis de la LDV con la GeIE purificada de *E. faecalis* DBH18 (**Tabla 7.4**). De la comparación de la AI-ECA de los hidrolizados lácteos con la cantidad de LHLPLP detectada por el ELISA-CI también se deduce que aunque la acumulación de LHLPLP se corresponde con un incremento de la AIECA de las muestras, no es posible la determinación de una relación lineal simple entre ambos parámetros.

Debido al creciente interés por el desarrollo de productos lácteos con propiedades biológicas deseables más allá de sus beneficios nutricionales, los resultados de este último estudio sugieren que la hidrólisis de la LDV por fermentación con *E. faecalis* DBH18 o *Lb. casei* CECT475 (pCG) o por hidrólisis enzimática con la GeIE purificada de ambas cepas, origina la producción de hidrolizados lácteos con una elevada AI-ECA, debido a la liberación de PI-ECAs así como la acumulación de péptidos como el LHLPLP de potente actividad antihipertensiva. La cepa de *Lb. casei* CECT475 (pCG) produce hidrolizados lácteos más seguros que los producidos por *E. faecalis* que codifican factores potenciales de virulencia. Por otra parte, la LDV hidrolizada con la GeIE purificada de *E. faecalis* DBH18 originó hidrolizados lácteos con una AI-ECA más elevada y una mayor acumulación del péptido antihipertensivo LHLPLP que los hidrolizados lácteos derivados de la hidrólisis de la LDV con la GeIE purificada de *Lb. casei* CECT475 (pCG). Debe destacarse, además, que con los resultados de este último estudio se ha demostrado por primera vez, a menos que desconozcamos la fuente de información, la capacidad de la GeIE purificada de originar hidrolizados lácteos de elevada AI-ECA, debido a la liberación de PI-ECAs así como de otros péptidos como el LHLPLP de potente AI-ECA y antihipertensiva.

CAPÍTULO *CHAPTER*

9

Conclusiones

Conclusions

Primera. La mayoría, pero no todas las cepas de *Enterococcus faecalis* de origen alimentario, ambiental y clínico producen hidrolizados lácteos con elevada actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina (AI-ECA) durante su desarrollo en leche desnatada de vaca (LDV), debido a la liberación de péptidos con AI-ECA (PI-ECAs) y otros péptidos bioactivos. La incidencia de factores potenciales de virulencia fue menor en las cepas de *E. faecalis* de origen alimentario y ambiental que en las cepas clínicas de referencia. Asimismo, las cepas de *E. faecalis* de origen alimentario y ambiental fueron genéticamente diferentes de las de origen clínico. Las cepas de *E. faecalis* de origen alimentario, ambiental y clínico producen péptidos bioactivos derivados de la LDV con efectos potencialmente beneficiosos para la salud y con posibles aplicaciones en la industria alimentaria, en medicina humana y veterinaria, y en producción animal.

Segunda. El diseño y construcción del plásmido recombinante pMLG2 que codifica la bacteriocina enterolisina A (EnIA) producida por *E. faecalis* DAC9 ha permitido la liberación controlada y expresión funcional de la EnIA por *L. lactis* subesp. *cremoris* NZ9000 (pMLG2) y *L. lactis* subesp. *lactis* IL1403 (pMLG2), lo que origina una reducción de la densidad óptica de los cultivos y del número de células viables durante su desarrollo en leche desnatada de vaca (LDV). Sin embargo, sólo los hidrolizados lácteos generados por la lisis inducida de *L. lactis* IL1403 (pMLG2) mostraron una mayor actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina (AI-ECA) que las cepas control, debido a la liberación de péptidos con AI-ECA (PI-ECAs).

Tercera. En este trabajo se ha obtenido la evidencia genética y bioquímica de que cepas recombinantes de *Enterococcus* spp. que expresan la gelatinasa (GelE) producida por *E. faecalis* DBH18 producen hidrolizados lácteos con elevada actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina (AI-ECA) y péptidos antihipertensivos. Dicha evidencia deriva de la clonación de los genes que codifican la GelE y serina proteasa (SprE), dos proteasas extracelulares producidas por *E. faecalis* DBH18, en el vector de expresión de promotor constitutivo pMG36c y la transferencia de los plásmidos derivados pCG (*gelE*), pCSP (*sprE*) y pCGSP (*gelE-sprE*) a cepas no caseinolíticas de *Enterococcus* spp. Sólo las cepas de *Enterococcus* spp. transformadas con pCG o pCGSP, pero no con pMG36c o pCSP así como la cepa de *E. faecalis* V583 Δ *gelE* transformada con pCG o pCGSP mostraron actividad caseinolítica y la producción de hidrolizados lácteos con elevada AI-ECA, debido a la liberación de péptidos con AI-ECA (PI-ECAs) y a la acumulación del péptido antihipertensivo LHLPLP durante su desarrollo en leche desnatada de vaca (LDV).

Cuarta. La transferencia por transformación de los plásmidos pCG (*gelE*) y pCGSP (*gelE-sprE*) a otras bacterias lácticas (BAL) potencialmente más seguras que los enterococos permitió la expresión de una actividad caseinolítica por cepas recombinantes de *Lactococcus lactis* IL1403, *L. lactis* NZ9000 y *Lactobacillus casei* CECT475. El desarrollo de *Lb. casei* CECT475 (pCG) y *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) en leche desnatada de vaca (LDV) ha permitido la obtención de hidrolizados lácteos con elevada actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina (AI-ECA), debido a la liberación de péptidos con AI-ECA (PI-ECAs) así como a la acumulación en los hidrolizados lácteos del péptido antihipertensivo LHLPLP.

Quinta. La hidrólisis enzimática de leche desnatada de vaca (LDV) con la gelatinasa (GelE) purificada a homogeneidad producida por *E. faecalis* DBH18 o *Lb. casei* CECT475 (pCG) ha permitido la obtención de hidrolizados lácteos con elevada actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina (AI-ECA), debido a la liberación de péptidos con AI-ECA (PI-ECA) y a la acumulación en los hidrolizados lácteos del péptido antihipertensivo LHLPLP. La GelE purificada de *E. faecalis* DBH18 permite la producción de hidrolizados lácteos con una mayor AI-ECA y acumulación del péptido LHLPLP en un tiempo mucho menor que el requerido para su obtención mediante la fermentación de la LDV con *E. faecalis* DBH18 o *Lb. casei* CECT475 (pCG).

Sexta. La obtención de anticuerpos policlonales de actividad predeterminada frente al péptido LHLPLP de la β -caseína bovina [$f(133-138)$] y el desarrollo de un ensayo inmunoenzimático competitivo indirecto (ELISA-CI) han permitido la detección y cuantificación del péptido antihipertensivo LHLPLP en los hidrolizados lácteos derivados de la fermentación de la leche desnatada de vaca (LDV) con bacterias lácticas (BAL), naturales o recombinantes, que expresan la gelatinasa (GelE) producida por *E. faecalis* DBH18, así como detectar y cuantificar su presencia en los hidrolizados lácteos derivados de la hidrólisis enzimática de la LDV con la GelE purificada de *E. faecalis* DBH18 o *Lb. casei* CECT475 (pCG). El ensayo inmunoquímico desarrollado constituye una alternativa sensible y rápida a otros métodos analíticos de detección y cuantificación de péptidos bioactivos en mezclas complejas de péptidos, incluyendo la espectrometría de masas.

First. Most, but not all *Enterococcus faecalis* strains from food, environmental and clinical origin produce milk derived-hydrolysates with high angiotensin converting enzyme-inhibitory activity (ACE-IA) due to the release of peptides with ACE-IA (ACE-IPs) and other bioactive peptides during their growth in bovine skim milk (BSM). The incidence of potentially virulent traits was lower in *E. faecalis* strains from food and environmental origin than in the clinical reference strains. Furthermore, *E. faecalis* strains from food and environmental origin were genetically different from those of clinical origin. The *E. faecalis* strains from food, environmental and clinical origin produce BSM-derived bioactive peptides with potential beneficial effects for human health and possible applications in the food industry, in human and veterinary medicine, and in the animal production field.

Second. The design and construction of the recombinant plasmid pMLG2 encoding the enterolysin A (EnlA) produced by *E. faecalis* DAC9 has permitted the controlled release and functional expression of EnlA by *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 (pMLG2) and *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 (pMLG2), with a reduction in the optical density of the bacterial cultures and the number of viable cells during their growth in bovine skim milk (BSM). However, only the BSM-derived hydrolysates produced by the induced lysis of *L. lactis* IL1403 (pMLG2) showed a higher angiotensin converting enzyme-inhibitory activity (ACE-IA) than the control strains, due to the release of peptides with ACE-IA (ACE-IPs).

Third. This work provides the genetic and biochemical evidence that recombinant *Enterococcus* spp. strains expressing the gelatinase (GelE) produced by *E. faecalis* DBH18 generate milk derived-hydrolysates with high angiotensin converting enzyme-inhibitory activity (ACE-IA) and antihypertensive peptides. This evidence derives from the cloning of genes encoding GelE and serine protease (SprE), two extracellular proteases from *E. faecalis* DBH18, into the expression vector pMG36c with a constitutive promoter and in the transformation of non-caseinolytic *Enterococcus* spp. strains with the resulting derived plasmids pCG (*gelE*), pCSP (*sprE*) and pCGSP (*gelE-sprE*). Only the *Enterococcus* spp. strains transformed with pCG or pCGSP but not with pMG36c or pCSP as well as the *E. faecalis* V583 Δ *gelE* strain transformed with pCG or pCGSP, showed caseinolytic activity and produced milk-derived hydrolysates with high ACE-IA due to the release of peptides with ACE-IA (ACE-IPs) and the accumulation of the antihypertensive peptide LHLPLP during their growth in bovine skim milk (BSM).

Fourth. The transformation of a number of lactic acid bacteria (LAB) potentially safer than enterococci with plasmids pCG (*gelE*) and pCGSP (*gelE-sprE*) permitted the expression of a caseinolytic activity by recombinant *Lactococcus lactis* IL1403, *L. lactis* NZ9000 and *Lb. casei* CECT475 strains. The growth of *Lb. casei* CECT475 (pCG) and *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) in bovine skim milk (BSM) has also permitted the production of BSM-derived hydrolysates with high angiotensin converting enzyme-inhibitory activity (ACE-IA) due to the release of peptides with ACE-IA (ACE-IPs) and the accumulation of the antihypertensive peptide LHLPLP.

Fifth. The enzymatic hydrolysis of bovine skim milk (BSM) with the gelatinase (GelE) purified to homogeneity from *E. faecalis* DBH18 or *Lb. casei* CECT475 (pCG) has permitted the production of BSM-derived hydrolysates with high angiotensin converting enzyme-inhibitory

activity (ACE-IA) due to the release of peptides with ACE-IA (ACE-IPs) and the antihypertensive peptide LHLPLP. The GelE purified from *E. faecalis* DBH18 permits the production in a much shorter incubation time of BSM-derived hydrolysates with a higher ACE-IA and peptide LHLPLP accumulation than those obtained during fermentation of BSM with *E. faecalis* DBH18 or *Lb. casei* CECT475 (pCG).

Sixth. The generation of polyclonal antibodies of predetermined activity against the antihypertensive peptide LHLPLP from bovine β -casein [f(133-138)] and the development of a competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (CI-ELISA), have permitted the detection and quantification of peptide LHLPLP in bovine skim milk (BSM) hydrolysates derived from the fermentation of BSM with natural or recombinant lactic acid bacteria (LAB) expressing the gelatinase (GelE) produced by *E. faecalis* DBH18. This peptide has been also quantified in the BSM-derived hydrolysates from the hydrolysis of BSM with the purified GelE from *E. faecalis* DBH18 or *Lb. casei* CECT475 (pCG). This immunochemical assay may represent a sensitive and fast alternative to other analytical methods including mass spectrometry for detection and quantification of bioactive peptides in complex peptide mixtures.

CAPÍTULO

10

Trabajo futuro

Como se ha descrito en otras secciones de esta memoria actualmente se conoce la existencia de péptidos bioactivos encriptados en la secuencia aminoacídica de muchas proteínas alimentarias entre los que destacan aquellos con actividad antimicrobiana, antihipertensiva, antioxidante, inmunomoduladora y anticancerígena, entre otras. Los péptidos bioactivos se encuentran encriptados en la secuencia aminoacídica de muchas proteínas siendo necesaria su hidrólisis para su liberación con enzimas gastrointestinales, por el uso de enzimas proteolíticas de diverso origen o por la fermentación de proteínas, sobre todo de origen lácteo, por el sistema enzimático de las bacterias lácticas (BAL). Asimismo, de gran interés es el reconocimiento de la existencia de péptidos bioactivos con actividad antihipertensiva y de su posible uso en la reducción y control de la hipertensión como factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y renales, de elevada incidencia en países desarrollados. La actividad antihipertensiva de los péptidos bioactivos se evalúa por la inhibición *in vitro* de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), una enzima reguladora clave del sistema renina-angiotensina implicada en la regulación fisiológica de la presión arterial o *in vivo* determinando la reducción de la tensión arterial en ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Por otra parte, las empresas alimentarias se enfrentan a la demanda por los consumidores de productos alimentarios más saludables. Así, la existencia en el mercado de productos enriquecidos con péptidos antihipertensivos podría permitir a los consumidores su utilización con efecto protector frente a numerosas enfermedades de origen vascular.

Por ello, en este trabajo se ha evaluado la capacidad de numerosas BAL y, sobre todo, de *E. faecalis* de origen alimentario, ambiental y clínico de producir hidrolizados lácteos con elevada actividad inhibidora de la ECA (AI-ECA) y de liberar péptidos con AI-ECA (PI-ECAs) y otros péptidos bioactivos durante su desarrollo en leche desnatada de vaca (LDV). Asimismo, el diseño construcción del plásmido recombinante pMLG2 que codifica la bacteriocina enterolisina A (EnIA) ha permitido la liberación controlada y expresión funcional de la EnIA por *L. lactis* subesp. *cremoris* NZ9000 (pMLG2) y *L. lactis* subesp. *lactis* IL1403 (pMLG2). Sin embargo, sólo los hidrolizados lácteos generados por la lisis inducida de *L. lactis* IL1403 (pMLG2) mostraron una mayor AI-ECA que las cepas control, debido a la liberación de PI-ECAs. Además, se ha logrado la evidencia genética y bioquímica de que la gelatinasa (GelE) producida por *E. faecalis* DBH18 es la responsable de la actividad liberadora de PI-ECAs así como de la producción de péptidos antihipertensivos y de otros péptidos antioxidantes y antimicrobianos. También se ha logrado la expresión funcional de la GelE producida por *E. faecalis* DBH18 en otras BAL potencialmente más seguras que los enterococos como *L. lactis* IL1403, *L. lactis* NZ9000 y *Lb. casei* CECT475 transformadas con los plásmidos pCG (*gelE*) y pCGSP (*gelE-sprE*). Finalmente, la purificación a homogeneidad de la GelE producida por *E. faecalis* DBH18 o *Lb. casei* CECT475 (pCG) también ha permitido la obtención de hidrolizados lácteos con elevada AI-ECA, debido a la liberación de PI-ECAs así como a la acumulación en los hidrolizados lácteos del péptido antihipertensivo LHLPLP. Además, la GelE purificada de *E. faecalis* DBH18 ha permitido la obtención de hidrolizados lácteos con mayor AI-ECA y acumulación del péptido LHLPLP en un tiempo mucho menor que el requerido para su obtención mediante la fermentación de la LDV con *E. faecalis* DBH18 o *Lb. casei* CECT475 (pCG).

De lo descrito en este trabajo se deduce el potencial de las cepas de *E. faecalis* de origen alimentario y ambiental con menos factores potenciales de virulencia y genéticamente diferentes de las de origen clínico como factorías celulares de producción de péptidos bioactivos potencialmente beneficiosos para la salud o como probióticos con aplicaciones en la industria alimentaria, en medicina humana y veterinaria, y en la producción animal. En este contexto, de especial interés sería la modificación genética de las cepas de *E. faecalis* más activas, como la de *E. faecalis* DBH18, para su evaluación como factorías celulares de producción de GelE o como probióticos más seguros tras la eliminación de su genoma de aquellos genes de mayor potencial patógeno o de resistencias a antibióticos mediante delecciones génicas dirigidas (mutantes *knockout*) que, tan exitosamente, han permitido la delección puntual del gen *gelE* de *E. faecalis* V583. Igualmente, la cepas de *E. faecalis* más proteolíticas con los genes potenciales de virulencia inactivados o no, así como muchas otras cepas de *E. faecalis* adaptadas a su desarrollo en otros sustratos alimentarios, deberían evaluarse no solamente por la producción de PI-ECAs y de péptidos antihipertensivos, antimicrobianos y antioxidantes sino, también, por la producción de otros péptidos bioactivos de interés como los antitrombóticos, antihipercolesterolémicos, inmunomoduladores y otros. Dichas experiencias deberían realizarse no solamente durante el desarrollo de las cepas de *E. faecalis* en LDV sino durante su desarrollo en otros sustratos alimentarios como los derivados de la carne y derivados cárnicos, pescados y mariscos, y vegetales.

De los resultados de este trabajo también se deduce que el diseño y construcción de vectores de expresión proteica que permiten la liberación controlada de enzimas con actividad hidrolítica sobre la pared celular de las BAL, facilitan la lisis controlada de las células productoras y la liberación de proteinasas y peptidasas intracelulares posiblemente involucradas en la producción de hidrolizados lácteos con elevada AI-ECA, debido a la liberación de PI-ECAs durante su desarrollo en LDV. Sin embargo, la A-IECA de los hidrolizados lácteos producidos por *L. lactis* IL1403 (pMLG2) fue mucho menor que la de hidrolizados producidos por las cepas de *E. faecalis* de origen alimentario, ambiental y clínico durante su desarrollo en LDV. Por ello, debería realizarse un mayor esfuerzo investigador en la evaluación y selección de BAL con un sistema intracelular proteolítico más potente que, una vez liberado al exterior mediante la lisis controlada de las BAL productoras, incremente la AI-ECA de los hidrolizados lácteos y la posibilidad de liberar un mayor número de péptidos con actividades biológicas diversas. Asimismo, el vector de expresión proteica pMLG2 construido durante la realización de este trabajo y que codifica la EnIA biológicamente activa, debería mostrar su utilidad en la evaluación de la AI-ECA y la producción de PI-ECAs y otros péptidos bioactivos durante la lisis inducida y controlada de diversas BAL transformadas con pMLG2, durante su desarrollo en diferentes sustratos alimentarios.

Durante este trabajo se ha procedido también a la determinación genética y bioquímica del papel de la GelE, producida por *E. faecalis* DBH18, en la elevada AI-ECA de hidrolizados lácteos derivados de la fermentación de la LDV con BAL productoras de GelE. Por ello, la producción heteróloga y expresión funcional de la gelatinasa (GelE) y serina proteasa (SprE), dos proteasas extracelulares de *E. faecalis* DBH18, por diversos *Enterococcus* spp. y otras BAL más seguras como *L. lactis* IL1403, *L. lactis* NZ9000 y *Lb. casei* CECT475 sin duda constituyen no solamente el inicio, sino el modelo experimental a seguir para la clonación, producción y expresión funcional

de otras proteasas y peptidasas producidas por BAL en otros hospedadores, microbianos o no microbianos, de interés biotecnológico. Asimismo, dado que el péptido señal de la GelE (PS_{GelE}) se ha mostrado eficaz para el procesamiento, transporte y expresión funcional de la GelE por cepas recombinantes de *Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp. y *Lb. casei* es posible que quimeras génicas del PS_{GelE} fusionado a la secuencia aminoacídica madura de muchas otras enzimas, proteínas o péptidos de interés biotecnológico podría permitir su clonación, producción y expresión funcional por diversos enterococos y, seguramente, otras BAL de interés. Por ello, de gran interés científico y aplicado sería también el diseño genético de BAL de origen alimentario o de levaduras, productoras de enzimas gastrointestinales o de otro origen, capaces de generar hidrolizados alimentarios de elevada AI-ECA o responsables de la liberación y acumulación de otros péptidos bioactivos. Así, el diseño de genes sintéticos que codifiquen la pepsina porcina o la pepsina humana con el codón de uso para su expresión por BAL y el uso de señales de secreción apropiadas podría permitir su clonación, producción y expresión funcional durante el desarrollo de las BAL recombinantes en LDV y otros sustratos alimenticios. Las BAL productoras de proteasas de interés tecnológico merecerían su reconocimiento como factorías celulares de producción de proteasas o como probióticos de interés biotecnológico. Asimismo, la clonación de los genes responsables de la síntesis de la pepsina porcina y humana y de su expresión funcional por levaduras, permitiría disponer de un sistema controlado y seguro de producción de enzimas proteolíticas de origen animal o humano, libres de microorganismos patógenos contaminantes y de una actividad específica constante.

De los resultados de este trabajo se deduce también el posible papel adicional, no asociado a su virulencia, de la GelE producida por *E. faecalis* de origen alimentario, ambiental y clínico debido a la liberación de péptidos bioactivos con efectos potencialmente beneficiosos en la salud de las personas y animales. Asimismo, de entre los péptidos bioactivos liberados durante el desarrollo de las BAL, naturales o recombinantes, en LDV cabe destacar el péptido LHLPLP derivado de la β -CN bovina, resistente a proteasas gastrointestinales, inhibidor competitivo de la ECA y con una potente actividad antihipertensiva *in vivo* en ratas espontáneamente hipertensas. Además, la obtención de anticuerpos policlonales con actividad predeterminada frente al péptido LHLPLP y el desarrollo de un ELISA competitivo indirecto (ELISA-CI) han permitido la detección y cuantificación de este péptido en los hidrolizados lácteos derivados de la fermentación de la LDV con las BAL productoras de GelE, así como en los hidrolizados lácteos derivados de la hidrólisis enzimática de la LDV con la GelE purificada de *E. faecalis* DBH18 y *Lb. casei* CECT475 (pCG). Asimismo, el que el péptido LHLPLP se cuantifique con facilidad en los hidrolizados lácteos calentados y filtrados de <3 kDa de tamaño molecular sugiere que los hidrolizados filtrados o las fracciones purificadas enriquecidas con el péptido LHLPLP podrían resultar atractivos como un ingrediente alimentario antihipertensivo. Por ello, debería realizarse un mayor esfuerzo investigador orientado a la purificación, parcial o a homogeneidad, de aquellas fracciones de los hidrolizados lácteos filtrados enriquecidas con el péptido LHLPLP.

También conviene destacar la determinación por primera vez, a menos que desconozcamos la fuente de información, de la capacidad de la GelE purificada a homogeneidad de liberar péptidos con elevada AI-ECA y péptidos antihipertensivos derivados de la hidrólisis enzimática de la LDV con tiempos de tratamiento mucho menores que los requeridos para su obtención

mediante la fermentación de la LDV con *E. faecalis* DBH18 o *Lb. casei* CECT475 (pCG). No obstante, de los resultados obtenidos en este trabajo se deduce que sería conveniente un mayor esfuerzo investigador conducente a la optimización de las condiciones de cultivo de las BAL, naturales o recombinantes, productoras de GelE así como de las condiciones de recuperación y purificación de la GelE mediante el empleo de otros procedimientos de separación y otras matrices cromatográficas. De gran interés científico y aplicado debería ser también la evaluación de la GelE purificada a homogeneidad en la liberación e identificación de péptidos con actividad antimicrobiana, antihipertensiva, antitrombótica, antihipercolesterolémica, inmunomoduladora o con otras actividades biológicas, durante la hidrólisis enzimática de muchos otros sustratos alimentarios de diverso origen con la GelE, parcialmente purificada o purificada a homogeneidad.

Resumen

Summary

INTRODUCCIÓN

El interés de los responsables de la salud pública y de los consumidores por la relación existente entre la dieta y salud se ha incrementado notablemente durante los últimos años. Aunque el seguimiento de una dieta sana, variada y equilibrada constituye la opción más adecuada para prevenir enfermedades y preservar la salud, dicho equilibrio es muchas veces difícil de mantener. A este respecto, los estilos de vida actuales han provocado que muchas personas abandonen los hábitos de alimentación saludables que durante años han formado parte de la historia y tradición de culturas como la mediterránea y que, por extensión, no sigan una alimentación equilibrada. Este hecho, junto con el aumento de la esperanza de vida ligado al incremento de los costes sanitarios y la necesidad de proporcionar una mejora en la calidad de vida de las personas ha impulsado el desarrollo de los denominados alimentos funcionales capaces de compensar los desequilibrios alimentarios, proporcionar un mejor estado de salud y bienestar y/o reducir el riesgo de padecer enfermedades. En este sentido, se ha demostrado que muchas proteínas alimentarias contienen encriptados en su estructura primaria secuencias de aminoácidos, denominadas péptidos bioactivos, que poseen efectos beneficiosos en la salud una vez liberados de sus precursores proteicos por hidrólisis gastrointestinal, por hidrólisis con enzimas proteolíticas purificadas y/o por la fermentación de proteínas, sobre todo de origen lácteo, por el sistema enzimático de las bacterias lácticas (BAL). Los péptidos bioactivos pueden desempeñar una gran variedad de actividades biológicas entre las que destacan la actividad antimicrobiana, antihipertensiva, antitrombótica, antihipercolesterolémica, inmunomoduladora y antioxidante, entre otras. Así, el potencial de los péptidos bioactivos para reducir el riesgo de padecer enfermedades crónicas y de promover la salud ha elevado su interés científico, aplicado y comercial. Entre los péptidos bioactivos derivados de proteínas alimentarias el estudio de los péptidos antihipertensivos ha cobrado fuerza dada la importancia de la hipertensión como factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y renales, de elevada incidencia en los países desarrollados. La actividad antihipertensiva de los péptidos bioactivos se determina tanto por la inhibición *in vitro* de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), una enzima reguladora clave del sistema renina-angiotensina importante para la regulación fisiológica de la presión arterial, como por la reducción *in vivo* de la tensión arterial de ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Por ello, la producción de péptidos con actividad inhibidora de la ECA (PI-ECA) derivados de sustratos alimentarios resulta de especial interés para el desarrollo de alimentos funcionales con actividad inhibidora de la ECA (AI-ECA).

En este contexto, la mayoría de las BAL empleadas en la industria alimentaria como cultivos iniciadores para la obtención de alimentos fermentados poseen un sistema proteolítico que, durante el proceso fermentativo, hidroliza las proteínas de la leche. Los péptidos y aminoácidos derivados de la hidrólisis de la leche constituyen una fuente de nitrógeno esencial para el desarrollo de los cultivos iniciadores, contribuyen a las características organolépticas del producto final y, además, pueden manifestar actividades biológicas de interés. En general, las modificaciones de las caseínas y otras proteínas de la leche por las BAL se deben, inicialmente, a su hidrólisis por acción de una proteinasa ligada a la pared celular (PPC) con la consecuente liberación de un gran número de oligopéptidos. A continuación, los oligopéptidos liberados son transportados al interior de las células por sistemas específicos de transporte de péptidos. Por

último, una vez dentro de las células los péptidos son hidrolizados de nuevo por la acción conjunta y coordinada de varias peptidasas hasta generar péptidos aún más pequeños y aminoácidos libres. En consecuencia, la hidrólisis de las proteínas lácteas por BAL durante la fermentación de la leche o por la actividad hidrolítica de sus proteasas o peptidasas purificadas constituye una aproximación atractiva para la producción de alimentos funcionales enriquecidos en péptidos bioactivos, debido a su bajo coste y a su positiva imagen nutricional.

OBJETIVOS

Por consiguiente, los objetivos de este trabajo de investigación han sido los siguientes:

(A). Evaluación, selección y caracterización de BAL de origen alimentario, ambiental y clínico con actividad inhibidora de la ECA (AI-ECA) y detección e identificación de péptidos con actividad inhibidora de la ECA (PI-ECAs) y otros péptidos bioactivos generados durante su desarrollo en leche desnatada de vaca (LDV).

(B). Diseño genético de cepas de *Lactococcus lactis* transformadas con vectores de expresión proteica que permitan la liberación controlada de enterolisina A (EnIA) y la lisis de las cepas productoras. Evaluación de la AI-ECA y detección e identificación de los PI-ECAs y otros péptidos bioactivos generados durante el desarrollo de las cepas recombinantes de *L. lactis* en LDV.

(C). Diseño genético de vectores de expresión proteica que permitan determinar el papel de la gelatinasa (GelE) y serina proteasa (SprE), dos proteasas extracelulares producidas por *Enterococcus faecalis* DBH18, en la producción de hidrolizados lácteos con AI-ECA y en la detección e identificación de PI-ECAs y otros péptidos bioactivos, producidos por cepas de *Enterococcus* spp. transformadas con dichos vectores.

(D). Evaluación de vectores de expresión proteica que codificando la GelE (*gelE*) y SprE (*sprE*) de *E. faecalis* DBH18 y transferidos por transformación a otras BAL de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Streptococcus* permitan la producción de hidrolizados lácteos con AI-ECA y la detección e identificación de PI-ECAs y otros péptidos bioactivos, generados durante su desarrollo en LDV.

(E). Purificación de la GelE a homogeneidad y evaluación de su papel en la producción de hidrolizados lácteos de elevada AI-ECA. Detección e identificación de los PI-ECAs y otros péptidos bioactivos generados durante la hidrólisis de la LDV con GelE.

RESULTADOS

Con la finalidad de lograr los objetivos propuestos se ha desarrollado el trabajo investigador que ha dado lugar a los resultados que se detallan a continuación.

1). Producción de péptidos inhibidores de la ECA (PI-ECAs) y otros péptidos bioactivos por cepas de *E. faecalis* de origen alimentario, ambiental y clínico durante su desarrollo en

leche desnatada de vaca (LDV). La primera parte del trabajo desarrollado durante la realización de esta tesis doctoral ha consistido en la evaluación de ochenta y siete BAL de diversos orígenes para determinar la actividad inhibidora de la ECA (AI-ECA) de los hidrolizados lácteos generados durante su desarrollo en LDV. Sólo aquellos cultivos que originaron una hidrólisis intensa de la LDV mostraron una elevada AI-ECA, con valores de IC_{50} de 16,1 a 28,4 μ g de proteína/ml. Igualmente, de los resultados obtenidos se determinó que la mayoría (87% activas) pero no todas (13% inactivas) las cepas de *E. faecalis* evaluadas fueron las de mayor AI-ECA. El análisis por RP-HPLC-MS/MS (del inglés, *Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*) de los hidrolizados lácteos de los cultivos de *E. faecalis* desarrollados en LDV y con una elevada AI-ECA permitió la identificación, entre los fragmentos peptídicos mayoritarios, de PI-ECAs y de un péptido antioxidante procedentes de las caseínas bovinas. Por otra parte, los hidrolizados lácteos de las cepas de *E. faecalis* evaluadas también mostraron actividad antimicrobiana frente a *Pedococcus damnosus* CECT4797 y *Listeria ivanovii* CECT913. A los enterococos se les atribuye un papel beneficioso en el desarrollo de las características sensoriales de los alimentos fermentados y algunos están permitidos para su uso como probióticos. Sin embargo, los enterococos son también colonizadores del tracto gastrointestinal de los mamíferos con estilos de vida que abarcan desde simbioses intestinales a patógenos multirresistentes a antibióticos y responsables de infecciones nosocomiales. Por ello, en este estudio se consideró conveniente determinar la posible presencia de factores potenciales de virulencia en las cepas de *E. faecalis* con elevada AI-ECA y productoras de PI-ECAs y otros péptidos bioactivos. La incidencia de factores potenciales de virulencia en las cepas de *E. faecalis* evaluadas fue variable, aunque se observó un menor número de ellos en las de origen alimentario y ambiental que en las cepas clínicas de referencia. Asimismo, para determinar la similitud e identidad genética de las cepas de *E. faecalis* con mayor AI-ECA se emplearon técnicas de electroforesis en campo pulsante (PFGE) y de MLST (del inglés, *Multilocus Sequence Typing*) lo que demostró que las cepas de *E. faecalis* de origen alimentario y ambiental eran genéticamente diferentes a las de origen clínico. En cualquier caso, ninguna de las cepas de origen alimentario y ambiental caracterizadas por MLST se incluyó en los complejos clonales CC2 y CC9 que agrupan a los *E. faecalis* de origen hospitalario. Así, se concluye que la mayoría pero no todas las cepas de *E. faecalis* de origen alimentario, ambiental y clínico producen péptidos bioactivos derivados de la LDV con efectos potencialmente beneficiosos para la salud y con posibles aplicaciones farmacéuticas, médicas y veterinarias.

2). Control de la lisis celular de cepas recombinantes de *Lactococcus lactis* mediada por la enterolisina A (EnIA) y producción de hidrolizados lácteos derivados de la leche desnatada de vaca con actividad inhibidora de la ECA (AI-ECA). Posteriormente, y con la idea de evaluar el papel de las proteasas intracelulares de *L. lactis* en la producción de hidrolizados lácteos con AI-ECA se procedió a la clonación del gen (*enIA*) de la enterolisina A (EnIA) de *E. faecalis* DAC9 en el vector de expresión proteica pMLG2, derivado del plásmido pMSP3545 y que codifica la EnIA bajo el control del promotor inducible P_{nisA} . La transferencia por transformación del vector pMLG2 a las cepas de *L. lactis* de interés permitió la producción heteróloga y liberación controlada de la EnIA por *L. lactis* subesp. *cremoris* NZ9000 y *L. lactis* subesp. *lactis* IL1403. La expresión de la EnIA inducida por la nisina por *L. lactis* NZ9000 (pMLG2) y *L. lactis* IL1403 (pMLG2), desarrolladas en GM17 y LDV, originó una reducción de la

densidad óptica (DO₆₀₀) de los cultivos del 85% y del 80%, respectivamente, tras 180 min desde la inducción así como una reducción del 99% del número de células viables. Sin embargo, solamente los hidrolizados lácteos derivados del desarrollo de *L. lactis* IL1403 (pMLG2) en LDV tras 48 h de su inducción con nisina mostraron una mayor AI-ECA que la de las cepas control. El análisis de los hidrolizados lácteos por RP-HPLC-MS/MS permitió la determinación del perfil peptídico y la identificación de los péptidos mayoritarios incluyendo los que poseen una AI-ECA conocida o que comparten, al menos, tres residuos aminoácidos de su región C-terminal con péptidos con una AI-ECA previamente descrita.

3). Evidencia genética y bioquímica de que cepas recombinantes de *Enterococcus* spp. que expresan la gelatinasa (GelE), producida por *E. faecalis* DBH18, producen hidrolizados lácteos derivados de leche desnatada de vaca (LDV) con actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) (AI-ECA) y péptidos antihipertensivos.

Los genes que codifican la gelatinasa (*gelE*) y la serina proteasa (*sprE*), dos proteasas extracelulares producidas por *E. faecalis* DBH18, se clonaron en el vector de expresión proteica pMG36c con el promotor constitutivo P₃₂ para generar los plásmidos recombinantes pCG, pCSP y pCGSP que codifican los genes *gelE*, *sprE* y *gelE-sprE*, respectivamente. La transformación de las cepas no caseinolíticas *E. faecalis* P36, *E. faecalis* JH2-2, *E. faecium* AR24 y *E. hirae* AR14 con los plásmidos descritos y con el plásmido control pMG36c permitió la detección de actividad caseinolítica sólo en las cepas transformadas con pCG y pCGSP. El diseño y obtención de un mutante por delección (*knockout*) de *E. faecalis* V583 (Δ *gelE*) para la producción de GelE y la recuperación de su actividad caseinolítica por complementación con el plásmido pCG, confirmaron que la GelE es responsable de la actividad caseinolítica de *E. faecalis* V583 Δ *gelE* (pCG) durante su desarrollo en LDV. Igualmente, sólo los *Enterococcus* spp. transformados con pCG o pCGSP produjeron hidrolizados lácteos con una elevada AI-ECA durante su desarrollo en LDV. Por otra parte, el análisis por RP-HPLC-MS/MS de los hidrolizados lácteos de las cepas recombinantes de *Enterococcus* spp. con una elevada AI-ECA permitió la identificación de 38 fragmentos peptídicos mayoritarios incluyendo péptidos de conocida AI-ECA, actividad antihipertensiva y actividad antioxidante. Además, la mayoría de los sitios de corte de los fragmentos peptídicos procedentes de la β -CN y la α _{s1}-CN bovinas se localizaron en enlaces peptídicos con los aminoácidos hidrofóbicos leucina (L), isoleucina (I) o fenilalanina (F), como se describió previamente con la GelE producida por *E. faecalis* OG1-10. Sin embargo, no se identificaron fragmentos peptídicos derivados del hipotético lugar corte de la SprE lo que sugiere que la SprE, por sí misma, no está implicada en la hidrólisis enzimática de las caseínas bovinas.

4). Producción heteróloga de proteasas por bacterias lácticas (BAL) y levaduras: *Lactobacillus casei* CECT475 que expresa la gelatinasa (GelE), producida por *E. faecalis* DBH18, libera péptidos inhibidores de la ECA (PI-ECAs) durante su desarrollo en leche desnatada de vaca (LDV). La transformación de BAL de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Streptococcus* con los plásmidos recombinantes pCG (*gelE*) o pCGSP (*gelE-sprE*) permitió la selección de cepas recombinantes de *L. lactis* IL1403, *L. lactis* NZ9000 y *Lactobacillus casei* CECT475 con actividad caseinolítica. Asimismo, el desarrollo de *Lb. casei* CECT475 (pCG) y *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) en LDV permitió la obtención de hidrolizados lácteos con una elevada AI-ECA. El análisis de los hidrolizados lácteos por RP-HPLC-MS/MS reveló la presencia de

péptidos con AI-ECA conocida, actividad antihipertensiva y actividad antioxidante. Por otra parte, la obtención de anticuerpos policlonales de actividad predeterminada frente al péptido antihipertensivo LHLPLP y el desarrollo de un ELISA competitivo indirecto (ELISA-CI) permitió la detección y cuantificación del péptido LHLPLP en los hidrolizados lácteos evaluados. Además, la clonación de fragmentos del gen *gelE* de *E. faecalis* DBH18 responsables de la síntesis de la proenzima de GelE (GE) y de la GelE madura (MGE) en los vectores de expresión proteica pPICZαA y pKLAC2 generó los plásmidos recombinantes pPICGE (GE), pPICMGE (MGE) y pKLGE (GE) que, a continuación, se linearizaron y transfirieron por transformación a células competentes de *Pichia pastoris* X-33 y *Kluyveromyces lactis* GG799. Sin embargo, ninguna de las cepas recombinantes de *P. pastoris* X-33GE (GE), *P. pastoris* X-33MG (MGE) y *K. lactis* GG799GE (GE) mostraron actividad extracelular caseinolítica o proteolítica.

5). La gelatinasa (GelE) purificada libera péptidos inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) (PI-ECAs) por hidrólisis de la leche desnatada de vaca (LDV). Otra aproximación a la producción de péptidos bioactivos derivados de la hidrólisis de caseínas bovinas ha consistido en la purificación de la GelE de *E. faecalis* DBH18 y *Lb. casei* CECT475 (pCG) una cepa natural y otra recombinante, respectivamente, productoras de GelE y en la evaluación de su capacidad de liberar PI-ECAs y otros péptidos bioactivos durante la hidrólisis enzimática de la LDV. El incremento de la actividad proteolítica específica y la recuperación de la actividad proteolítica inicial fue mayor en la GelE purificada de *E. faecalis* DBH18 que en la de *Lb. casei* CECT475 (pCG). La hidrólisis de la LDV por fermentación con *E. faecalis* DBH18 o *Lb. casei* CECT475 (pCG) así como por hidrólisis enzimática con la GelE purificada a homogeneidad originó hidrolizados lácteos de elevada AI-ECA. Sin embargo, la GelE purificada precisó de tiempos de incubación más cortos que los cultivos de *E. faecalis* DBH18 y *Lb. casei* CECT475 para la producción de hidrolizados lácteos derivados de la LDV con elevada AI-ECA. El análisis por MALDI-TOF/MS de los hidrolizados lácteos, fermentados con *E. faecalis* DBH18 o *Lb. casei* CECT475 (pCG) o hidrolizados con la GelE purificada a homogeneidad, permitió la identificación de péptidos mayoritarios con AI-ECA y actividad antihipertensiva previamente descritos. Sin embargo, los hidrolizados lácteos derivados de la hidrólisis de LDV con la GelE de *E. faecalis* DBH18 purificada a homogeneidad mostraron la AI-ECA más elevada y la mayor producción del péptido antihipertensivo LHLPLP. Debe destacarse que los resultados descritos sugieren por primera vez, a menos que desconozcamos la fuente de información, la capacidad de la GelE purificada de originar hidrolizados lácteos de elevada AI-ECA debido a la liberación de PI-ECAs de potente AI-ECA y antihipertensiva.

CONCLUSIONES

Primera. La mayoría, pero no todas las cepas de *Enterococcus faecalis* de origen alimentario, ambiental y clínico producen hidrolizados lácteos con elevada actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina (AI-ECA) durante su desarrollo en leche desnatada de vaca (LDV), debido a la liberación de péptidos con AI-ECA (PI-ECAs) y otros péptidos bioactivos. La incidencia de factores potenciales de virulencia fue menor en las cepas de *E. faecalis* de origen alimentario y ambiental que en las cepas clínicas de referencia. Asimismo, las cepas de *E. faecalis* de origen alimentario y ambiental fueron genéticamente diferentes de las de origen

clínico. Las cepas de *E. faecalis* de origen alimentario, ambiental y clínico producen péptidos bioactivos derivados de la LDV con efectos potencialmente beneficiosos para la salud y con posibles aplicaciones en la industria alimentaria, en medicina humana y veterinaria, y en producción animal.

Segunda. El diseño y construcción del plásmido recombinante pMLG2 que codifica la bacteriocina enterolisina A (EnIA) producida por *E. faecalis* DAC9 ha permitido la liberación controlada y expresión funcional de la EnIA por *L. lactis* subesp. *cremoris* NZ9000 (pMLG2) y *L. lactis* subesp. *lactis* IL1403 (pMLG2), lo que origina una reducción de la densidad óptica de los cultivos y del número de células viables durante su desarrollo en leche desnatada de vaca (LDV). Sin embargo, sólo los hidrolizados lácteos generados por la lisis inducida de *L. lactis* IL1403 (pMLG2) mostraron una mayor actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina (AI-ECA) que las cepas control, debido a la liberación de péptidos con AI-ECA (PI-ECAs).

Tercera. En este trabajo se ha obtenido la evidencia genética y bioquímica de que cepas recombinantes de *Enterococcus* spp. que expresan la gelatinasa (GelE) producida por *E. faecalis* DBH18 producen hidrolizados lácteos con elevada actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina (AI-ECA) y péptidos antihipertensivos. Dicha evidencia deriva de la clonación de los genes que codifican la GelE y serina proteasa (SprE), dos proteasas extracelulares producidas por *E. faecalis* DBH18, en el vector de expresión de promotor constitutivo pMG36c y la transferencia de los plásmidos derivados pCG (*gelE*), pCSP (*sprE*) y pCGSP (*gelE-sprE*) a cepas no caseinolíticas de *Enterococcus* spp. Sólo las cepas de *Enterococcus* spp. transformadas con pCG o pCGSP, pero no con pMG36c o pCSP así como la cepa de *E. faecalis* V583 Δ *gelE* transformada con pCG o pCGSP mostraron actividad caseinolítica y la producción de hidrolizados lácteos con elevada AI-ECA, debido a la liberación de péptidos con AI-ECA (PI-ECAs) y a la acumulación del péptido antihipertensivo LHLPLP durante su desarrollo en leche desnatada de vaca (LDV).

Cuarta. La transferencia por transformación de los plásmidos pCG (*gelE*) y pCGSP (*gelE-sprE*) a otras bacterias lácticas (BAL) potencialmente más seguras que los enterococos permitió la expresión de una actividad caseinolítica por cepas recombinantes de *Lactococcus lactis* IL1403, *L. lactis* NZ9000 y *Lactobacillus casei* CECT475. El desarrollo de *Lb. casei* CECT475 (pCG) y *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) en leche desnatada de vaca (LDV) ha permitido la obtención de hidrolizados lácteos con elevada actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina (AI-ECA), debido a la liberación de péptidos con AI-ECA (PI-ECAs) así como a la acumulación en los hidrolizados lácteos del péptido antihipertensivo LHLPLP.

Quinta. La hidrólisis enzimática de leche desnatada de vaca (LDV) con la gelatinasa (GelE) purificada a homogeneidad producida por *E. faecalis* DBH18 o *Lb. casei* CECT475 (pCG) ha permitido la obtención de hidrolizados lácteos con elevada actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina (AI-ECA), debido a la liberación de péptidos con AI-ECA (PI-ECAs) y a la acumulación en los hidrolizados lácteos del péptido antihipertensivo LHLPLP. La GelE purificada de *E. faecalis* DBH18 permite la producción de hidrolizados lácteos con una mayor AI-ECA y acumulación del péptido LHLPLP en un tiempo mucho menor que el requerido

para su obtención mediante la fermentación de la LDV con *E. faecalis* DBH18 o *Lb. casei* CECT475 (pCG).

Sexta. La obtención de anticuerpos policlonales de actividad predeterminada frente al péptido LHLPLP de la β -caseína bovina [f(133-138)] y el desarrollo de un ensayo inmunoenzimático competitivo indirecto (ELISA-CI) han permitido la detección y cuantificación del péptido antihipertensivo LHLPLP en los hidrolizados lácteos derivados de la fermentación de la leche desnatada de vaca (LDV) con bacterias lácticas (BAL), naturales o recombinantes, que expresan la gelatinasa (GelE) producida por *E. faecalis* DBH18, así como detectar y cuantificar su presencia en los hidrolizados lácteos derivados de la hidrólisis enzimática de la LDV con la GelE purificada de *E. faecalis* DBH18 o *Lb. casei* CECT475 (pCG). El ensayo inmunológico desarrollado constituye una alternativa sensible y rápida a otros métodos analíticos de detección y cuantificación de péptidos bioactivos en mezclas complejas de péptidos, incluyendo la espectrometría de masas.

BIBLIOGRAFÍA

- Bryan, E. M., Bae, T., Kleerebezem, M. y Dunne, G. M. (2000). Improved vectors for nisin-controlled expression in gram-positive bacteria. *Plasmid* 44:183-190.
- Contreras, M. M., Carrón, R., Montero, M. J., Ramos, M. y Recio, I. (2009). Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *Int. Dairy J.* 19:566-573.
- Eaton, T. J. y Gasson, M. J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1628-1635.
- FitzGerald, R. J. y Murray, B. A. (2006). Bioactive peptides and lactic fermentations. *Int. J. Dairy Technol.* 59:118-125.
- FitzGerald, R. J., Murray, B. A. y Walsh, G. J. (2004). Hypotensive peptides from milk proteins. *J. Nutr.* 134:980S-988S.
- Franz, C. M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W. y Gálvez, A. (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 151:125-40.
- Hancock, L. E. y Perego, M. (2004). The *Enterococcus faecalis* *fsr* two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. *J. Bacteriol.* 186:5629-5639.
- Korhonen, H. y Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *Int. Dairy J.* 16:945-960.
- Makinen, P., Clewell, D. B., An, F. y Makinen, K. K. (1989). Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metalloendopeptidase ("gelatinase") from *Streptococcus faecalis* (strain OG1-10.). *J. Biol. Chem.* 264:3325-3334.
- Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., Recio, I. y Hernández-Ledesma, B. (2012). Antihypertensive peptides from proteins: a review. *Food Funct.* 3:350-361.
- Miguel, M., Muguerza, B., Sanchez, E., Delgado, M. A., Recio, I., Ramos, M. y Aleixandre, A. (2005). Changes in arterial blood pressure in hypertensive rats caused by long-term intake of milk fermented by *Enterococcus faecalis* CECT 5728. *Br. J. Nutr.* 94:36-43.

- Nielsen, M. S., Martinussen, T., Flambard, B., Sørensen, K. I. y Otte, J. (2009). Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: Effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. *Int. Dairy J.* 19:155-165.
- Ogier, J.-C. y Serror, P. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126:291-301.
- Otte, J., Lenhard, T., Flambard, B. y Sørensen, K. I. (2011). Influence of fermentation temperature and autolysis on ACE-inhibitory activity and peptide profiles of milk fermented by selected strains of *Lactobacillus helveticus* and *Lactococcus lactis*. *Int. Dairy J.* 21:229-238.
- Phelan, M. y Kerins, D. (2011). The potential role of milk-derived peptides in cardiovascular disease. *Food Funct.* 2:153-167.
- Picón, A., García-Casado, M. A. y Nuñez, M. (2010). Proteolytic activities, peptide utilization and oligopeptide transport systems of wild *Lactococcus lactis* strains. *Int. Dairy J.* 20:156-162.
- Quirós, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A. y Recio, I. (2007). Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *Int. Dairy J.* 17:33-41.
- Ruiz-Garbajosa, P., Bonten, M. J., Robinson, D. A., Top, J., Nallapareddy, S. R., Torres, C., Coque, T. M., Canton, R., Baquero, F., Murray, B. E., del Campo, R. y Willems, R. J. (2006). Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of evolution. *J. Clin. Microbiol.* 44:2220-2228.
- Savijoki, K., Ingmer, H. y Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71:394-406.
- Sentandreu, M. A. y Toldra, F. (2006). A fluorescence-based protocol for quantifying angiotensin converting enzyme activity. *Nat. Protoc.* 1:2423-2427.
- Teixeira, N., Santos, S., Marujo, P., Yokohata, R., Iyer, V. S., Nakayama, J., Hancock, L. E., Serror, P. y Silva Lopes, M. F. (2012). The incongruent gelatinase genotype and phenotype in *Enterococcus faecalis* are due to shutting off the ability to respond to the gelatinase biosynthesis-activating pheromone (GBAP) quorum-sensing signal. *Microbiology* 158:519-528.
- Unger, T. (2002). The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *Am. J. Cardiol.* 89:3-10.
- Waters, C. M., Antiporta, M. H., Murray, B. E. y Dunny, G. M. (2003). Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. *J. Bacteriol.* 185:3613-3623.

INTRODUCTION

The interest of public health authorities and consumers in the relationship between diet and health has increased considerably during the last few years. Although following a healthy, varied and balanced diet represent the most suitable option to prevent diseases and preserve health, this balance is often difficult to maintain. In this regard, current lifestyles have led many consumers to abandon healthy eating habits that for years have been a part of the history and tradition of cultures such as the Mediterranean and by extension to fail following a balanced diet. This fact, together with an increasing life expectancy, increasing healthcare costs and the need for an improvement in the quality of life has prompted the development of the so-called functional foods which are able to compensate nutritional imbalances providing a better health condition and wellness while decreasing the risk of developing diseases. In this sense, it is known that many food proteins contain, encrypted within their primary structure, bioactive peptides with beneficial effects on human health once released from their protein precursors by gastrointestinal hydrolysis, by hydrolysis with purified specific proteolytic enzymes and/or by fermentation of food proteins, mainly milk proteins, by the proteolytic system of lactic acid bacteria (LAB). Bioactive peptides can exhibit a number of biological activities such as antimicrobial, antihypertensive, antithrombotic, antihypercholesterolemic, immunomodulatory and antioxidant, among others. Thus, the potential of these bioactive peptides to reduce the risk of developing chronic diseases and to promote human health has raised its scientific, applied and commercial importance. Among the bioactive peptides derived from food proteins the study of peptides with antihypertensive activity has gained strength given the importance of hypertension as a risk factor in the development of cardiovascular and renal diseases, with a high incidence in the western population. The antihypertensive activity of bioactive peptides is evaluated by the *in vitro* inhibition of the angiotensin converting enzyme (ACE), a fundamental regulatory enzyme in the renin-angiotensin system with an important role in the physiological regulation of blood pressure, and by the *in vivo* reduction of the blood pressure of spontaneously hypertensive rats (SHR). Therefore, the production of peptides with ACE-inhibitory activity (ACE-IPs) from food proteins is of particular interest in the development of functional foods with ACE-inhibitory activity (ACE-IA).

In this context, the LAB commonly used in the food industry as starter cultures in the production of fermented products have a proteolytic system that hydrolyses milk proteins during their fermentation. Peptides and amino acids derived from the hydrolysis of milk proteins constitute an essential source of nitrogen to sustain the growth of LAB, contribute to the organoleptic properties of the final product and display biological activities. The use of caseins by LAB usually starts with the hydrolysis of these proteins by a cell-wall associated proteinase (CEP) with the subsequent release of a great number of oligopeptides. Then, the oligopeptides are transported inside the cells by specific peptide transport systems. Finally, once inside the cells the peptides are further hydrolyzed by the coordinated and joint action of several endopeptidases which produce smaller peptides and free amino acids. Accordingly, the hydrolysis of milk proteins during their fermentation by LAB or by the use of purified proteases and peptidases constitute an attractive approach for the production of functional foods enriched with bioactive peptides, due to its economic cost and positive nutritional image.

OBJECTIVES

Accordingly, the objectives of this research work have been the following:

(A). Evaluation, selection and characterization of LAB from food, environmental and clinical origin producers of milk-derived hydrolysates with high ACE-inhibitory activity (ACE-IA) and detection and identification of ACE-inhibitory peptides (ACE-IPs) and other bioactive peptides during their growth in bovine skim milk (BSM).

(B). Genetic design of *Lactococcus lactis* strains transformed with protein expression vectors to drive the controlled release of enterolysin A (EnIA) and the lysis of the EnIA-producer strains. Evaluation of the ACE-IA and detection and identification of ACE-IPs and other bioactive peptides during growth of the recombinant *Lactococcus lactis* strains in BSM.

(C). Genetic design of protein expression vectors to determine the role of gelatinase (GelE) and serine protease (SprE), two extracellular proteases produced by *Enterococcus faecalis* DBH18, in the production of milk-derived hydrolysates with ACE-IA and detection and identification of ACE-IPs and other bioactive peptides, released by the *Enterococcus* spp. strains transformed with these vectors.

(D). Evaluation of protein expression vectors that encoding the GelE (*gelE*) and SprE (*sprE*) from *E. faecalis* DBH18 and transferred by transformation to LAB from the genera *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Streptococcus* could permit the production of milk-derived hydrolysates and the detection and identification of ACE-IPs and other bioactive peptides during their growth in BSM.

(E). Purification of mature GelE to homogeneity and evaluation of its role in the production of milk-derived hydrolysates with high ACE-IA. Detection and identification of ACE-IPs and other bioactive peptides generated during the enzymatic hydrolysis of BSM with GelE.

RESULTS

To achieve the proposed objectives the following experimental work has been performed, with the results detailed below.

1). *Enterococcus faecalis* strains from food, environmental, and clinical origin produce ACE-inhibitory peptides (ACE-IPs) and other bioactive peptides during their growth in bovine skim milk (BSM). The first part of the work performed during the realization of this doctoral thesis consisted in the evaluation of eighty seven LAB from different origins for their ability to produce milk-derived hydrolysates of high ACE-IA during their growth in BSM. Only those cultures producing an intense hydrolysis of the BSM showed a high ACE-IA with IC₅₀ values of 16.1 to 28.4 µg/ml. It could be also determined that most (87% active) but not all (13% inactive) of the evaluated *E. faecalis* strains were responsible of the highest ACE-IA. The RP-HPLC-MS/MS (*Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*) analysis of the BSM-derived hydrolysates with high ACE-IA produced by the *E.*

faecalis cultures during their growth in BSM permitted the identification among the major peptide fragments of several ACE-IPs and an antioxidant peptide derived from bovine caseins. On the other hand, the *E. faecalis* hydrolysates also showed antimicrobial activity against *Pediococcus damnosus* CECT4797 and *Listeria ivanovii* CECT913. The enterococci are known to have a beneficial role in the development of the sensorial characteristics of fermented foods and some are used as probiotics. However, the enterococci are also colonizers of the gastrointestinal tract of mammals with lifestyles ranging from intestinal symbionts to antibiotic multiresistant pathogens responsible of nosocomial infections. Therefore, in this study was considered convenient to determine the possible presence of potential virulence factors in the *E. faecalis* strains producing BSM-derived hydrolysates with ACE-IPs and other bioactive peptides. The incidence of virulence factors in the evaluated *E. faecalis* strains was variable. However, less virulence factors were observed in the food and environmental strains than in the clinical reference strains. To determine the identity and genetic similarity of the *E. faecalis* strains displaying the highest ACE-IA pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST) techniques were used to show that *E. faecalis* strains of food and environmental origin were genetically different from those of clinical origin. In any case, none of the characterized *E. faecalis* strains from food and environmental origin were included in the clonal complexes CC2 and CC9 of the hospital-adapted *E. faecalis* isolates. Accordingly, most but not all of the *E. faecalis* strains from food, environmental and clinical origin produce bioactive peptides with human health connotations and potential food, pharmaceutical, medical, and veterinary applications.

2). Controlled enterolysin A (EnIA)-mediated lysis and production of bovine skim milk (BSM)-derived hydrolysates with angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitory activity (ACE-IA) by recombinant *Lactococcus lactis*. To evaluate the role of the intracellular proteases and peptidases from *L. lactis* in the production of milk-derived hydrolysates with ACE-IA the enterolysin A (EnIA) gene (*enIA*) from *E. faecalis* DAC9 was cloned into the protein expression vector pMLG2, derived from plasmid pMSP3545 with the expression of *enIA* under control of the inducible P_{nisA} promoter. Thus, the transformation of competent *L. lactis* cells with pMLG2 permitted the heterologous expression and controlled release of EnIA by recombinant *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 and *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 derivatives. The nisin-induced expression of *enIA* by *L. lactis* NZ9000 (pMLG2) and *L. lactis* IL1403 (pMLG2), grown in GM17 and BSM, originated an 85% and 80% reduction, respectively, of the optical density (OD₆₀₀) of the cultures and a reduction of 99% of the number of viable cells. However, a high ACE-IA was only observed in the BSM-derived hydrolysates of *L. lactis* IL1403 (pMLG2) after 48 h of induction with nisin. Analysis of these hydrolysates by RP-HPLC-MS/MS permitted the identification of major peptide fragments with known ACE-IA or sharing at least three C-terminal residues with those displaying ACE-IA.

3). Genetic and biochemical evidence that recombinant *Enterococcus* spp. strains, expressing the gelatinase (GelE), produced by *E. faecalis* DBH18, produce bovine skim milk (BSM)-derived hydrolysates with angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitory activity (ACE-IA) and antihypertensive peptides. Genes encoding gelatinase (*gelE*) and serine proteinase (*sprE*), two extracellular proteases produced by *E. faecalis* DBH18, were cloned into the protein expression vector pMG36c containing the constitutive P_{32} promoter generating the

recombinant plasmids pCG, pCSP and pCGSP encoding *gelE*, *sprE* and *gelE-sprE*, respectively. Transformation of non-caseinolytic *E. faecalis* P36, *E. faecalis* JH2-2, *E. faecium* AR24, and *E. hirae* AR14 strains with these plasmids as well as with the control plasmid pMG36c resulted in detection of caseinolytic activity only in the strains transformed with pCG or pCGSP. The design and construction of a deletion (*knockout*) mutant of *E. faecalis* V583 (Δ *gelE*) unable to display GelE activity and the recovery of its caseinolytic activity by complementation with plasmid pCG further supports that *gelE* is responsible for the caseinolytic activity of *E. faecalis* V583 Δ *gelE* (pCG) grown in BSM. BSM-derived hydrolysates with high ACE-IA were only obtained from the recombinant *Enterococcus* spp. strains transformed with pCG or pCGSP. RP-HPLC-MS/MS analysis of those hydrolysates allowed the identification of 38 major peptide fragments including peptides with previously reported ACE-IA, antihypertensive and antioxidant activity. Furthermore, most of the cleavage sites of the peptide fragments generated from β -casein and α_{s1} -casein involved the hydrophobic amino acid residues leucine (L), isoleucine (I) or phenylalanine (F) as previously described for the GelE produced by *E. faecalis* OG1-10. However, no peptide fragments derived from a putative SprE proteolytic activity were detected in the BSM-derived hydrolysates which would suggest that SprE itself is not involved in the hydrolysis of bovine caseins.

4). Heterologous expression of proteases by lactic acid bacteria (LAB) and yeasts: *Lactobacillus casei* CECT475 expressing the gelatinase (GelE), produced by *E. faecalis* DBH18, releases ACE-inhibitory peptides (ACE-IPs) during growth in bovine skim milk (BSM). Transformation of LAB from the genera *Lactococcus*, *Lactobacillus* and *Streptococcus* with the recombinant plasmids pCG (*gelE*) or pCGSP (*gelE-sprE*) permitted the selection of *L. lactis* IL1403, *L. lactis* NZ9000 and *Lactobacillus casei* CECT475 derivatives with caseinolytic activity. Growth of *Lb. casei* CECT475 (pCG) and *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) in BSM produced BSM-derived hydrolysates with high ACE-IA. RP-HPLC-MS/MS analysis of these hydrolysates revealed the release of peptide fragments with previously reported ACE-IA, antihypertensive and antioxidant activities. Moreover, the generation of polyclonal antibodies of predetermined specificity for peptide LHLPLP and the development of a competitive indirect ELISA (CI-ELISA) permitted the detection and quantification of peptide LHLPLP in the BSM-derived hydrolysates. On the other hand, the cloning of fragments of the *gelE* gene from *E. faecalis* DBH18 responsible for the synthesis of the GelE proenzyme (GE) and mature GelE (MGE) into the pPICZ α A and pKLAC2 protein expression vectors resulted in the recombinant plasmids pPICGE, pPICMGE and pKLGE which were then linearized and transferred by transformation to *Pichia pastoris* X-33 and *Kluyveromyces lactis* GG799. However, none of the recombinant *P. pastoris* X-33GE (GE), *P. pastoris* X-33MGE (MGE) and *K. lactis* GG799GE (GE) displayed extracellular caseinolytic or proteolytic activity.

5). Purified gelatinase (GelE) releases angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides (ACE-IPs) from bovine skim milk (BSM). Another approach to the production of bioactive peptides derived from the hydrolysis of bovine caseins has relied on the purification of the GelE from *E. faecalis* DBH18, a natural GelE-producer strain, and from *Lb. casei* CECT475 (pCG), a recombinant GelE-producer strain, and in the evaluation of its ability to release ACE-IPs and other bioactive peptides during the hydrolysis of BSM. The increase in the specific proteolytic

activity and the recovery of the initial GelE was higher with the GelE purified from *E. faecalis* DBH18 than from *Lb. casei* CECT475 (pCG). The hydrolysis of BSM either by fermentation with *E. faecalis* DBH18 or *Lb. casei* CECT475 (pCG) or by enzymatic hydrolysis with the GelE purified to homogeneity generated BSM-derived hydrolysates of high ACE-IA. Moreover, the purified GelE required shorter incubation times than bacterial cultures for production of BSM-derived hydrolysates of high ACE-IA. MALDI-TOF/MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Tandem Time of Flight Mass Spectrometry*) analysis of the hydrolysates derived from either fermentation or enzymatic hydrolysis of BSM with *E. faecalis* DBH18 or *Lb. casei* CECT475 (pCG) or the GelE purified to homogeneity, respectively, permitted the identification of previously described peptides with ACE-IA and antihypertensive activity. The hydrolysates derived from the hydrolysis of BSM with the GelE purified from *E. faecalis* DBH18 showed the highest ACE-IA and accumulation of the antihypertensive peptide LHLPLP. It should be also noted that the results of this study demonstrates for the first time, unless unknown information sources, the ability of purified GelE to produce BSM-derived hydrolysates with high ACE-IA due to the release of ACE-IPs of potent ACE-IA and antihypertensive activity.

CONCLUSIONS

First. Most, but not all *Enterococcus faecalis* strains from food, environmental and clinical origin produce milk derived-hydrolysates with high angiotensin converting enzyme-inhibitory activity (ACE-IA) due to the release of peptides with ACE-IA (ACE-IPs) and other bioactive peptides during their growth in bovine skim milk (BSM). The incidence of potentially virulent traits was lower in *E. faecalis* strains from food and environmental origin than in the clinical reference strains. Furthermore, *E. faecalis* strains from food and environmental origin were genetically different from those of clinical origin. The *E. faecalis* strains from food, environmental and clinical origin produce BSM-derived bioactive peptides with potential beneficial effects for human health and possible applications in the food industry, in human and veterinary medicine, and in the animal production field.

Second. The design and construction of the recombinant plasmid pMLG2 encoding the enterolysin A (EnlA) produced by *E. faecalis* DAC9 has permitted the controlled release and functional expression of EnlA by *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 (pMLG2) and *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 (pMLG2), with a reduction in the optical density of the bacterial cultures and the number of viable cells during their growth in bovine skim milk (BSM). However, only the BSM-derived hydrolysates produced by the induced lysis of *L. lactis* IL1403 (pMLG2) showed a higher angiotensin converting enzyme-inhibitory activity (ACE-IA) than the control strains, due to the release of peptides with ACE-IA (ACE-IPs).

Third. This work provides the genetic and biochemical evidence that recombinant *Enterococcus* spp. strains expressing the gelatinase (GelE) produced by *E. faecalis* DBH18 generate milk derived-hydrolysates with high angiotensin converting enzyme-inhibitory activity (ACE-IA) and antihypertensive peptides. This evidence derives from the cloning of genes encoding GelE and serine protease (SprE), two extracellular proteases from *E. faecalis* DBH18, into the expression vector pMG36c with a constitutive promoter and in the transformation of non-

caseinolytic *Enterococcus* spp. strains with the resulting derived plasmids pCG (*gelE*), pCSP (*sprE*) and pCGSP (*gelE-sprE*). Only the *Enterococcus* spp. strains transformed with pCG or pCGSP but not with pMG36c or pCSP as well as the *E. faecalis* V583 Δ *gelE* strain transformed with pCG or pCGSP, showed caseinolytic activity and produced milk-derived hydrolysates with high ACE-IA due to the release of peptides with ACE-IA (ACE-IPs) and the accumulation of the antihypertensive peptide LHLPLP during their growth in bovine skim milk (BSM).

Fourth. The transformation of a number of lactic acid bacteria (LAB) potentially safer than enterococci with plasmids pCG (*gelE*) and pCGSP (*gelE-sprE*) permitted the expression of a caseinolytic activity by recombinant *Lactococcus lactis* IL1403, *L. lactis* NZ9000 and *Lb. casei* CECT475 strains. The growth of *Lb. casei* CECT475 (pCG) and *Lb. casei* CECT475 (pCGSP) in bovine skim milk (BSM) has also permitted the production of BSM-derived hydrolysates with high angiotensin converting enzyme-inhibitory activity (ACE-IA) due to the release of peptides with ACE-IA (ACE-IPs) and the accumulation of the antihypertensive peptide LHLPLP.

Fifth. The enzymatic hydrolysis of bovine skim milk (BSM) with the gelatinase (GelE) purified to homogeneity from *E. faecalis* DBH18 or *Lb. casei* CECT475 (pCG) has permitted the production of BSM-derived hydrolysates with high angiotensin converting enzyme-inhibitory activity (ACE-IA) due to the release of peptides with ACE-IA (ACE-IPs) and the antihypertensive peptide LHLPLP. The GelE purified from *E. faecalis* DBH18 permits the production in a much shorter incubation time of BSM-derived hydrolysates with a higher ACE-IA and peptide LHLPLP accumulation than those obtained during fermentation of BSM with *E. faecalis* DBH18 or *Lb. casei* CECT475 (pCG).

Sixth. The generation of polyclonal antibodies of predetermined activity against the antihypertensive peptide LHLPLP from bovine β -casein [*f*(133-138)] and the development of a competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (CI-ELISA), have permitted the detection and quantification of peptide LHLPLP in bovine skim milk (BSM) hydrolysates derived from the fermentation of BSM with natural or recombinant lactic acid bacteria (LAB) expressing the gelatinase (GelE) produced by *E. faecalis* DBH18. This peptide has been also quantified in the BSM-derived hydrolysates from the hydrolysis of BSM with the purified GelE from *E. faecalis* DBH18 or *Lb. casei* CECT475 (pCG). This immunochemical assay may represent a sensitive and fast alternative to other analytical methods including mass spectrometry for detection and quantification of bioactive peptides in complex peptide mixtures.

REFERENCES

- Bryan, E. M., Bae, T., Kleerebezem, M., and Dunny, G. M. (2000). Improved vectors for nisin-controlled expression in gram-positive bacteria. *Plasmid* 44:183-190.
- Contreras, M. M., Carrón, R., Montero, M. J., Ramos, M., and Recio, I. (2009). Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *Int. Dairy J.* 19:566-573.
- Eaton, T. J., and Gasson, M. J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1628-1635.

- FitzGerald, R. J., and Murray, B. A. (2006). Bioactive peptides and lactic fermentations. *Int. J. Dairy Technol.* 59:118-125.
- FitzGerald, R. J., Murray, B. A., and Walsh, G. J. (2004). Hypotensive peptides from milk proteins. *J. Nutr.* 134:980S-988S.
- Franz, C. M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., and Gálvez, A. (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 151:125-40.
- Hancock, L. E., and Perego, M. (2004). The *Enterococcus faecalis* *fsr* two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. *J. Bacteriol.* 186:5629-5639.
- Korhonen, H., and Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *Int. Dairy J.* 16:945-960.
- Makinen, P., Clewell, D. B., An, F., and Makinen, K. K. (1989). Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metalloendopeptidase ("gelatinase") from *Streptococcus faecalis* (strain OG1-10.). *J. Biol. Chem.* 264:3325-3334.
- Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., Recio, I., and Hernández-Ledesma, B. (2012). Antihypertensive peptides from proteins: a review. *Food Funct.* 3:350-361.
- Miguel, M., Muguerza, B., Sanchez, E., Delgado, M. A., Recio, I., Ramos, M., and Aleixandre, A. (2005). Changes in arterial blood pressure in hypertensive rats caused by long-term intake of milk fermented by *Enterococcus faecalis* CECT 5728. *Br. J. Nutr.* 94:36-43.
- Nielsen, M. S., Martinussen, T., Flambard, B., Sørensen, K. I., and Otte, J. (2009). Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: Effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. *Int. Dairy J.* 19:155-165.
- Ogier, J.-C., and Serror, P. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126:291-301.
- Otte, J., Lenhard, T., Flambard, B., and Sørensen, K. I. (2011). Influence of fermentation temperature and autolysis on ACE-inhibitory activity and peptide profiles of milk fermented by selected strains of *Lactobacillus helveticus* and *Lactococcus lactis*. *Int. Dairy J.* 21:229-238.
- Phelan, M., and Kerins, D. (2011). The potential role of milk-derived peptides in cardiovascular disease. *Food Funct.* 2:153-167.
- Picón, A., García-Casado, M. A., and Nuñez, M. (2010). Proteolytic activities, peptide utilization and oligopeptide transport systems of wild *Lactococcus lactis* strains. *Int. Dairy J.* 20:156-162.
- Quirós, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A., and Recio, I. (2007). Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *Int. Dairy J.* 17:33-41.
- Ruiz-Garbajosa, P., Bonten, M. J., Robinson, D. A., Top, J., Nallapareddy, S. R., Torres, C., Coque, T. M., Canton, R., Baquero, F., Murray, B. E., del Campo, R., and Willems, R. J. (2006). Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of evolution. *J. Clin. Microbiol.* 44:2220-2228.
- Savijoki, K., Ingmer, H., and Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71:394-406.
- Sentandreu, M. A., and Toldra, F. (2006). A fluorescence-based protocol for quantifying angiotensin-converting enzyme activity. *Nat. Protoc.* 1:2423-2427.

- Teixeira, N., Santos, S., Marujo, P., Yokohata, R., Iyer, V. S., Nakayama, J., Hancock, L. E., Serror, P., and Silva Lopes, M. F. (2012). The incongruent gelatinase genotype and phenotype in *Enterococcus faecalis* are due to shutting off the ability to respond to the gelatinase biosynthesis-activating pheromone (GBAP) quorum-sensing signal. *Microbiology* 158:519-528.
- Unger, T. (2002). The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *Am. J. Cardiol.* 89:3-10.
- Waters, C. M., Antiporta, M. H., Murray, B. E., and Dunny, G. M. (2003). Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. *J. Bacteriol.* 185:3613-3623.

Bibliografía

- Aakra, A., Nyquist, L., Snipen, L., Reiersen, T. y Nes, L. F. (2007). Survey of genomic diversity among *Enterococcus faecalis* strains by microarray-based comparative genomic hybridisation. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:2207-2217.
- Aarestrup, F. M., Butaye, P. y White, W. (2002). Non human reservoirs of enterococci. En *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance*, pp:55-59. Editado por: M. S. Gilmore. American Society for Microbiology. Washington, Estados Unidos.
- Abriouel, H., Benomar, N., Molinos, A. C., López, R. L., Grande, M. J., Martínez-Viedma, P., Ortega, E., Cañamaro, M. M. y Gálvez, A. (2008). Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water, soil, and clinical samples. *Int. J. Food Microbiol.* 123:38-49.
- Abubakar, A., Saito, T., Kitazawa, H., Kawai, Y. y Itoh, T. (1998). Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *J. Dairy Sci.* 81:3131-3138.
- Adams, J. J., Anderson, B. F., Norris, G. E., Creamer, L. K. y Jameson, G. F. (2006). Structure of bovine β -lactoglobulin (variant A) at very low ionic strength. *J. Struct. Biol.* 3:246-254.
- Adams, M. R. (1999). Safety of industrial lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 68:171-178.
- Addeo, F., Chianese, L., Salzano, A., Sacchi, R., Cappuccino, U., Ferranti, P. y Malorni, A. (1992). Characterization of the 12% trichloroacetic acid-insoluble oligopeptides of Parmigiano-Reggiano cheese. *J. Dairy Res.* 59:401-411.
- Agerholm-Larsen, L., Bell, M. L., Grunwald, G. K. y Astrup, A. (2000). The effect of a probiotic milk product on plasma cholesterol: a meta-analysis of short-term intervention studies. *Eur. J. Clin. Nutr.* 54:856-860.
- Aguirre, M. y Collins, M. D. (1993). Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J. Appl. Bacteriol.* 75:95-107.
- AgYEI, D. y Danquah, M. K. (2010). Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnol. Adv.* 29:272-177.
- Aleixandre, A., Miguel, M. y Muguerza, B. (2008). Peptides with antihypertensive activity obtained from milk and egg proteins. Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas de leche y huevo. *Nutr. Hosp.* 23:313-318.
- Anadón, A., Martínez, M. A., Ares, I., Ramos, E., Martínez-Larrañaga, M. R., Contreras, M. M., Ramos, M. y Recio, I. (2010). Acute and repeated dose (4 weeks) oral toxicity studies of two antihypertensive peptides, RYLGY and AYFYPEL, that correspond to fragments (90-94) and (143-149) from α _{s1}-casein. *Food Chem. Toxicol.* 48:1836-1845.
- Arai, S. (1996). Studies on functional foods in Japan-state of the art. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60:9-15.
- Arias, C. A. y Murray, B. E. (2012). The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 10(4):266-278.
- Asp, N.-G., Cummings, J. H., Howlett, J., Rafter, J., Riccardi, G. y Westenhoefer, J. (2004). PASSCLAIM. Process for the Assessment of Scientific Support for Claims on Foods. Phase Two: Moving forward. *Eur. J. Nutr.* [Suppl 2] 43:II/1-II/2.
- Aukrust, T. W., Brurberg, M. B. y Nes, I. F. (1995). Transformation of *Lactobacillus* by electroporation. *Methods Mol. Biol.* 47:201-208.
- Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria: classification and physiology. En *Lactic Acid Bacteria*, pp. 1-72. Editado por: Salminen, S. y Von Wright, A. Marcel Dekker Inc. Nueva York, Estados Unidos.
- Barbosa, J., Gibbs, P. A. y Teixeira, P. (2010). Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. *Food Control.* 21:651-656.
- Basanta, A. (2008). Evaluación de la enterocina L50 (L50A y L50B) de *Enterococcus faecium* L50 como bioconservante de la cerveza: producción y secreción heteróloga de las enterocinas L50A y L50B en *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*. *Tesis Doctoral*. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Becquet, P. (2003). EU assessment of enterococci as feed additives. *Int. J. Food Microbiol.* 88:247-254.
- Belem, M. A. F., Gibbs, B. F. y Lee, B. H. (1999). Proposing sequences for peptides derived from whey fermentation with potential bioactive sites. *J. Dairy Sci.* 82:486-493.
- Bellomo, G., Mangiagale, A., Nicastro, L. y Frigerio, G. (1980). A controlled double-blind study of SF68 strain as a new biological preparation for the treatment of diarrhoea in pediatrics. *Curr. Ther. Res.* 28:927-936.

- Ben Embarek, P. K., From Jeppesen, V. y Hus, H. H. (1994). Antilisterial potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from sous-vide cooked fish fillets. *Food Microbiol.* 11:525-536.
- Ben Omar, N., Castro, A., Lucas, R., Abriouel, H., Yousif, N. M. K., Franz, C. M. A. P., Holzapfel, W. H., Pérez-Pulido, R., Martínez-Cañamero, M. y Gálvez, A. (2004). Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. *System. Appl. Microbiol.* 27:118-130.
- Benyacoub, J., Czarnecki-Maulden, G. L., Cavadini, C., Sauthier, T., Anderson, R. E., Schiffrin, E. J. y von der Weid, T. (2003). Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune functions in young dogs. *J. Nutr.* 133:1158-1162.
- Berlec, A., Tompa, G., Slapar, N., Fonović, U. P., Rogelj, I. y Strukelj, B. (2008). Optimization of fermentation conditions for the expression of sweet-tasting protein brazzein in *Lactococcus lactis*. *Letf. Appl. Microbiol.* 46:227-31.
- Bernardeau, M., Vernoux, J. P., Hemri-Dubernet, S. y Guéguen, M. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126:278-285.
- Biswas, I., Gruss, A., Ehlich, S. D. y Maguin, E. (1993). High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 175:3628-3635.
- Blomqvist, T., Steinmoen, H. y Haavarstein, L. S. (2006). Natural genetic transformation: a novel tool for efficient genetic engineering of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:6751-6756.
- Boekhorst, J., Siezen, R. J., Zwahlen, M. C., Vilanova, D., Pridmore, R. D., Mercenier, A., Kleerebezem, M., de Vos, W. M., Brüssow, H. y Desiere, F. (2004) The complete genomes of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus johnsonii* reveal extensive differences in chromosome organization and gene content. *Microbiology* 150:3601-3611.
- Böer, E., Steinborn, G., Kunze, G. y Gellissen, G. (2007). Yeast expression platforms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77:513-523.
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarme, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D. y Sorokin, A. (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* 11:731-753.
- Borrero, J. (2011). Caracterización de bacteriocinas y desarrollo de herramientas genéticas para su producción heteróloga en otras bacterias lácticas (BAL) y en las levaduras *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha* y *Arxula adeninivorans*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Borrero, J., Brede, D. A., Skaugen, M., Diep, D. B., Herranz, C., Nes, I. F., Cintas, L. M. y Hernández, P. E. (2011). Characterization of garvicin ML, a novel circular bacteriocin produced by *Lactococcus garvieae* DCC43, isolated from Mallard ducks, (*Anas platyrhynchos*). *Appl. Environ. Microbiol.* 77:369-373.
- Borrero, J., Kunze, G., Jiménez, J. J., Böer, E., Gútiérrez, L., Herranz, C., Cintas, L. M. y Hernández, P. E. (2012). Cloning, production, and functional expression of the bacteriocin enterocin A, produced by *Enterococcus faecium* T136, by the yeasts *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, and *Arxula adeninivorans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:5956-61.
- Bourgogne, A., Hilsenbeck, S. G., Dunny, G. M. y Murray, B. E. (2006). Comparison of OG1RF and an isogenic *fsrB* isogenic deletion mutant by transcriptional analysis: the *Fsr* system of *Enterococcus faecalis* is more than an activator of gelatinase and serine protease. *J. Bacteriol.* 188:2875-2884.
- Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M. y Vidal-Carou, M. C. (2001). Biogenic amine formation sausages formulated with and without sugar. *Meat Sci.* 57:215-221.
- Brock, T. D. y Davies, J. M. (1963). Probable identity of a group D hemolysin with a bacteriocin. *J. Bacteriol.* 134:229-236.
- Brockmeier, U., Caspers, M., Freudl, R., Jockwer, A., Noll, T. y Eggert, T. (2006). Systematic screening of all signal peptides from *Bacillus subtilis*: a powerful strategy in optimizing heterologous protein secretion in Gram-positive bacteria. *J. Mol. Biol.* 362:393-402.
- Bron, P. A. y Kleerebezem, M. (2011). Engineering lactic acid bacteria for increased industrial functionality. *Bioeng. Bugs.* 2:80-87.
- Brown, N. J. y Vaughan, D. E. (1998). Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Circulation* 97:1411-1420.
- Bryan, E. M., Bae, T., Kleerebezem, M. y Dunny, G. M. (2000). Improved vectors for nisin-controlled expression in gram-positive bacteria. *Plasmid* 44:183-190.

- Buist, G., Karsens, H., Nauta, A., van Sinderen, D., Venema, G. y Kok, J. (1997). Autolysis of *Lactococcus lactis* caused by induced overproduction of its major autolysin, AcmA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2722-2728.
- Bütikofer, U., Meyer, J., Sieber, R. y Wechsler, D. (2007). Quantification of the angiotensin-converting enzyme-inhibiting tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in hard, semi-hard and soft cheeses. *Int. Dairy J.* 17:968-975.
- Bütikofer, U., Meyer, J., Sieber, R., Walther, B. y Wechsler, D. (2008). Occurrence of the angiotensin-converting enzyme-inhibiting tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in different cheese varieties of Swiss origin. *J. Dairy Sci.* 91:29-38.
- Campbell, D. J. (2003). The renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35:784-791.
- Campos, C. A., Rodríguez, O., Calo-Mata, P., Prado, M. y Barros-Velázquez, J. (2006). Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). *Food Res. Int.* 39:356-364.
- Caplice, E. y Fitzgerald G. F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50:131-149.
- Capuco, A. V. y Akers, R. M. (2009). The origin and evolution of lactation. *J. Biol.* 8:27.
- Carmel, A. y Yaron, A. (1978). An intramolecularly quenched fluorescent tripeptide as a fluorogenic substrate of angiotensin-I-converting enzyme and of bacterial dipeptidyl carboxypeptidase. *Eur. J. Biochem.* 87:265-273.
- Carr, F. J., Chill, D. y Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.* 28:281-370.
- Casalta, E. y Montel, M.-C. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126:271-273.
- Casaus, M.P. (1998). Aislamiento e identificación de bacterias lácticas de origen cárnico productoras de bacteriocinas. Caracterización bioquímica y genética de la enterocina P de *Enterococcus faecium* P13 y de la enterocina B de *Enterococcus faecium* T136. *Tesis Doctoral*. Universidad Complutense de Madrid.
- Cassens, P. W. J. R., Visser, S., Gruppen, H. y Voragen, A. G. J. (1999). β -Lactoglobulin hydrolysis. 1. Peptide composition and functional properties of hydrolysates obtained by the action of plasmin, trypsin, and *Staphylococcus aureus* V8 protease. *J. Agric. Food Chem.* 47:2973-2979.
- Cat, A. N. D. y Toyuz, R. M. (2011). A new look at the renin-angiotensin system-focusing on the vascular system. *Peptides* 32:2141-2150.
- Cereghino, G. P. y Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:45-66.
- Chang, B.-W., Chen, R. L. C., Huang, I.-J. y Chang, H.-C. (2001). Assays for angiotensin-converting enzyme inhibitory activity. *Anal. Biochem.* 291:84-88.
- Chaves-López, C., Serio, A., Matrascelli, M., Papparella, A., Osorio-Cadavid, E. y Suzzi, G. (2011). Microbiological characteristics of kumis, a traditional fermented Colombian milk, with particular emphasis on enterococci population. *Food Microbiol.* 28:1041-1047.
- Chen, C. C., Kong, M. S., Lai, M. W., Chao, H. C., Chang, K. W., Chen, S. Y., Huang, Y. C., Chiu, C. H., Li, W. C., Lin, P. Y., Chen, C. J. y Li, T. Y. (2010). Probiotics have clinical, microbiological, and immunologic efficacy in acute infectious diarrhea. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 29:135-138.
- Chen, G.-W., Tsai, J.-S. y Pan, B. S. (2007). Purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides and antihypertensive effect of milk produced by protease-facilitated lactic fermentation. *Int. Dairy J.* 17:641-647.
- Chen, Z. Y., Peng, C., Jiao, R., Wong, Y. M., Yang, N. y Huang, Y. (2009). Anti-hypertensive nutraceuticals and functional foods. *J. Agric. Food Chem.* 57:4485-4499.
- Cheung, H. S., Wang, F. L., Ondetti, M. A., Sabo, E. H. y Cushman, D. W. (1980). Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 255:401-407.
- Chobert, J.-M., El-Zahar, K., Sitohy, M., Dalgallarrondo, M., Métro, F., Haertlé, C. y Haertlé, T. (2005). Angiotensin-I-converting-enzyme (ACE)-inhibitory activity tryptic peptides of ovine β -lactoglobulin and of milk yogurts obtained by using different starter. *Lait* 85:141-152.
- Chopin, M. C., Chopin, A., Moillo-Bott, A. y Langella, P. (1984). Two plasmid-determined restriction and modification systems in *Streptococcus lactis*. *Plasmid* 11:260-263.

- Christensen, J. E., Dudley, E. G., Pederson, J. A. y Steele, J. L. (1999). Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76:217-246.
- Cintas, L. M. y Casaus, P. (1998). La necesidad de conservar los alimentos. *Bioconservación. Alim. Equip. Tecnol.* Diciembre: 89-95.
- Cintas, L. M., Casaus, P. y Hernández, P. E. (2000). Bacterias lácticas de origen alimentario. Consideraciones taxonómicas y filogenéticas. *Alimentaria* 318:61-70.
- Cintas, L. M., Casaus, M. P., Herranz, C., Nes I. F. y Hernández P. E. (2001). Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Sci. Tech. Int.* 7:281-305.
- Citti, R. (2005). Aislamiento e identificación de bacterias lácticas bacteriocinogénicas de leches y quesos de búfala de Venezuela: actividad antimicrobiana y caracterización bioquímica y genética de sus bacteriocinas. *Tesis Doctoral*. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Clewell, D. B. (1993). Bacterial sex pheromone-induce plasmid transfer. *Cell* 73:9-12.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 16th informational supplement. M100-S16. Wayne, PA: CLSI, 2009.
- Coburn, P. S., Baghdayan, A. S., Dolan, G. T. y Shankar, N. (2007). Horizontal transfer of virulence genes encoded on the *Enterococcus faecalis* pathogenicity island. *Mol. Microbiol.* 63:530-544.
- Coburn, P. S. y Gilmore, M. S. (2003). The *E. faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cell Microbiol.* 5:661-669.
- Coburn, P. S., Pillar, C. M., Jett, B. D., Haas, W. y Gilmore, M. S. (2004). *Enterococcus faecalis* senses target cells and in response expresses cytolysin. *Science* 306:2270-2272.
- Cocconcelli, P. S., Cattivelli, D. y Gazzola, S. (2003). Gene transfer of vancomycin and tetracycline resistances among *Enterococcus faecalis* during cheese and sausage fermentations. *Int. J. Food. Microbiol.* 88:315-323.
- Codex Alimentarius. WHO/FAO. <http://www.codexalimentarius.org/>.
- Collin, M. y Olsen, A. (2000). Generation of a mature streptococcal cysteine proteinase is dependent on cell wall-anchored M1 protein. *Mol. Microbiol.* 36:1306-1318.
- Comisión del Codex Alimentarius. Manual de procedimiento. (2011). FAO/ WHO Press, Rome.
- Comisión del Codex Alimentarius CAC/GL 23-1997. Directrices para el Uso de Declaraciones Nutricionales y Saludables. FAO/ WHO Press, Rome.
- Contreras, M. M., Carrón, R., Montero, M. J., Ramos, M. y Recio, I. (2009). Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *Int. Dairy J.* 19:566-573.
- Coque, T. M., Seetulsingh, P., Singh, K. V. y Murray, B. E. (1998). Application of molecular techniques to the study of nosocomial infections caused by enterococci. En *Methods in Molecular Medicine Vol. 15: Molecular Bacteriology: Protocols and Clinical Applications*, pp. 469-493. Editado por: Woodford, N., & Johnson. A. Humana Press. Totowa, NJ, EEUU.
- Coque, T. M., Willems, R., Canton, R., del Campo, R. y Baquero, F. (2002). High occurrence of *esp* among ampicillin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* clones from hospitalized patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 50:1035-1038.
- Corrêa, A. P., Daroit, D. J., Coelho, J., Meira, S. M., Lopes, F. C., Segalin, J., Risso, P. H. y Brandelli, A. (2011). Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. *J. Sci. Food Agric.* 91(12):2247-2254.
- Cotter, P. D., Hill, C. y Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Rev. Microbiol.* 3:777-788.
- Cox, C. R., Coburn, P. S. y Gilmore, M. S. (2005). Enterococcal cytolysin: a novel two component peptide system that serves as a bacterial defense against eukaryotic and prokaryotic cells. *Curr. Protein Pept. Sci.* 6:77-84.
- Crow, V. L., Coolbear, T., Gopal, P. K., Martley, F. G., McKay, L. L. y Riepe, H. (1995). The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. *Int. Dairy J.* 5:855-875.
- Cushman, D. W. y Cheung, H. S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* 20:1637-1648.
- Cushman, D. W., Cheung, H. S., Sabo, E. F. y Ondetti, M. A. (1977). Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. *Biochemistry* 16:5484-5491.

- Cushman, D. W., Pluscec, J., Williams, N. J., Weaver, E. R., Sabo, E. F., Kocy, O. y col. (1973). Inhibition of angiotensin-converting enzyme by analogs of peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Experientia* 29:1032-1035.
- Dargere, S., Vergnaud, M., Verdon, R., Saloux, E., Le Page, O., Leclercq, R. y Bazin, C. (2002). *Enterococcus gallinarum* endocarditis occurring on native heart valves. *J. Clin. Microbiol.* 40:2308-2310.
- De Leo, F., Panarese, S., Gallerani, R. y Ceci, L. R. (2009). Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides: production and implementation of functional food. *Curr. Pharm. Design.* 15:3622-3643.
- de Ruyter, P. G. G. A., Kuipers, O. P. y de Vos, W. M. (1996). Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* using the food-grade inducer nisin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3662-3667.
- de Ruyter, P. G., Kuipers, O. P., Meijer, W. C. y de Vos, W. M. (1997). Food-grade controlled lysis of *Lactococcus lactis* for accelerated cheese ripening. *Nat. Biotechnol.* 15:976-979.
- De Vos, W. M. (1999). Safe and sustainable systems for food-grade fermentations by genetically modified lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 9:3-10.
- De Vos, W. M. (2011). System solutions by lactic acid bacteria: from paradigms to practice. *Microb. Cell. Fact.* 10:S2.
- De Vuyst, L., Foulquié-Moreno, M. R. y Revets, H. (2003). Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *Int. J. Food Microbiol.* 84:299-318.
- De Vuyst, L. y Leroy, F. (2007). Bacteriocin from Lactic Acid Bacteria: production, purification and food applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13:194-199.
- Del Campo, R., Tenorio, C., Jiménez-Díaz, R., Rubio, C., Gómez-Lus, R., Baquero, F. y Torres, C. (2001). Bacteriocin production in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus* isolates of different origins. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 45(3):905-912.
- Del Papa, M. F., Hancock, L. E., Thomas, V. C. y Perego, M. (2007). Full activation of *Enterococcus faecalis* gelatinase by a C-terminal proteolytic cleavage. *J. Bacteriol.* 189:8835-8843.
- den Hengst, C. D., Curley, P., Larsen, R., Buist, G., Nauta, A., van Sinderen, D., Kuipers, O. P. y Kok, J. (2005a). Probing direct interactions between CodY and the *oppD* promoter of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 187:512-521.
- den Hengst, C. D., van Hijum, S. A. F. T., Geurts, J. M. W., Nauta, A., Kok, J. y Kuipers, O. P. (2005b). The *Lactococcus lactis* CodY regulon: identification of a conserved *cis*-regulatory element. *J. Biol. Chem.* 280:34332-34342.
- Deegan, L. H., Cotter, P. D., Hill, C. y Ross P. (2006). Bacteriocins: biological tools for biopreservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 16:1058-1071.
- Dellaglio, F., Dicks, L. M. T. y Torriani, S. (1995). The genus *Leuconostoc*. En *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, pp. 235-278. Editado por: Wood, B. J. B. y Holzapfel, W. H. Blackie Academic & Professional. Londres, Reino Unido.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L. y Debevere, J. (2004). New preservation technologies: possibilities and limitations. *Int. Dairy J.* 14:273-285.
- Devriese, L. A., Hommez, J., Wjffels, R. y Haesebrouck, F. (1991). Composition of the enterococcal and streptococcal intestinal flora of poultry. *J. Appl. Bacteriol.* 71:46-50.
- Devriese, L. A. y Pot, B. (1995). The genus *Enterococcus*. En *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, vol. 2, pp. 327-367. Editado por: Wood, B. J. B. y Holzapfel, W. H. Blackie Academic & Professional. Londres, Reino Unido.
- Devriese, L. A., Hommez, J., Pot, B., y Haesebrouck, F. (1994). Identification and composition of the streptococcal and enterococcal flora of tonsils, intestines and faeces of pigs. *J. Appl. Bacteriol.* 77:31-36.
- Dickinson, H. O., Mason, J. M., Nicolson, D. J., Campbell, F., Beyer, F. R., Cook, S. W., Williams, B. y Ford, G. A. (2006). Lifestyle interventions to reduce raised blood pressure: a systematic review of randomised controlled trials. *J. Hypertens.* 24:215-233.
- Diep, D. B., Mathiesen, G., Eijsink, V. G. y Nes, I. F. (2009). Use of lactobacilli and their pheromone-based regulatory mechanism in gene expression and drug delivery. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 10:62-73.
- Diplock, A. T., Aggett, P. J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E. B. y Roberfroid, M. B. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *Br. J. Nutr.* 81:Suppl. 1:1-27.

- Doeven, M. K., Kok, J. y Poolman, B. (2005). Specificity and selectivity determinants of peptide transport in *Lactococcus lactis* and other microorganisms. *Mol. Microbiol.* 57:640-649.
- Domann, E., Hain, T., Ghai, R., Billion, A., Kuenne, C., Zimmermann, K. y Chakraborty, T. (2007). Comparative genomic analysis for the presence of potential enterococcal virulence factors in the probiotic *Enterococcus faecalis* strain Symbioflor 1. *Int. J. Med. Microbiol.* 297:533-539.
- Domig, K. J., Mayer, H. K. y Kneifel, W. (2003). Methods used for isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus* spp. 2. Pheno- and genotypic criteria. *Int. J. Food Microbiol.* 88:165-188.
- Donelli, G., Paoletti, C., Baldassarri, L., Guaglianone, E., di Rosa, R., Magi, G., Spinaci, C. y Facinelli, B. (2004). Sex pheromone response, clumping, and slime production in enterococcal strains isolated from occluded biliary stents. *J. Clin. Microbiol.* 42:3419-3427.
- Donkor, O. N., Henriksson, A., Singh, T. K., Vasiljevic, T. y Shah, N. P. (2007). ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. *Int. Dairy J.* 17:1321-1331.
- Donlan, R. M. y Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:167-193.
- Dupré, I., Zanetti, S., Schito, A. M., Fadda, G. y Secchi, L. A. (2003). Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *J. Med. Microbiol.* 52:491-498.
- Eaton, T. J. y Gasson, M. J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1628-1635.
- Eaton, T. J. y Gasson, M. J. (2002). A variant enterococcal surface protein Esp_{fm} in *Enterococcus faecium*; distribution among food, commensal, medical, and environmental isolates. *FEMS Microbiol. Lett.* 216:269-275.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2007). Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA on the introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *EFSA Journal* 587:1-16.
- EFSA (European Food Safety Authority). Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). (2012). Guidance on the safety assessment of *Enterococcus faecium* in animal nutrition. *EFSA Journal* 10:2682.
- Egan, A. F. (1983). Lactic acid bacteria of meat and meat products. *Antonie van Leeuwenhoek.* 49:327-336.
- Engberink, M. F., Schouten, E. G., Kok, F. J., Van Mierlo, L. A. J., Brouwer, I. A. y Geleijnse, J. M. (2008). Lactotripeptides show no effect on human blood pressure: Results from a double-blind randomized controlled trial. *Hypertension* 51:399-405.
- Engelbert, M., Mylonakis, E., Ausubel, F. M., Calderwood, S. B. y Gilmore, M. S. (2004). Contribution of gelatinase, serine protease, and *fsr* to the pathogenesis of *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. *Infect. Immun.* 72:3628-3633.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. y Ishizaki, A. (2000). Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:85-106.
- Eúzeby, J. P. (1997). List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet. *Int. J. Sys Bacteriol.* 47(2): 590-592.
- Ezzati, M., Lopez, A. D., Rodgers, A., Vander Hoorn, S. y Murray, C. J. (2002). Comparative risk assessment collaborating group. Selected major risk factors and global and regional burden of disease. *Lancet* 360:1347-1360.
- Fang, G., Konings, W. N. y Bert, P. (2000). Kinetics and substrate specificity of membrane-reconstituted peptide transporter DtpT of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 182:2530-2535.
- FAO/WHO. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London Ontario, Canada. April 30 and May 1, 2002:1-11.
- Farrell Jr., H. M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K. y col. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk - Sixth revision. *J. Dairy Sci.* 87:1641-1674.
- Fernandez-Esplà, M. D., Garault, P., Monnet, V. y Rul, F. (2000). *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4772-4778.

- Ferreira, S. H., Bartelt, D. C. y Greene, L. J. (1970). Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry* 9:2583-2593.
- FitzGerald, R. J. y Murray, B. A. (2006). Bioactive peptides and lactic fermentations. *Int. J. Dairy Technol.* 59:118-125.
- FitzGerald, R. J., Murray, B. A. y Walsh, G. J. (2004). Hypotensive peptides from milk proteins. *J. Nutr.* 134:980S-988S.
- Foucaud, C., Kunji, E. R., Hagting, A., Richard, J., Konings, W. N., Desmazeaud, M. y Poolman, B. (1995). Specificity of peptide transport systems in *Lactococcus lactis*: evidence for a third system which transports hydrophobic di- and tripeptides. *J. Bacteriol.* 177:4652-4657.
- Foulquié-Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. y De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 106:1-24.
- Fracalanza, S. A., Scheidegger, E. M., Santos, P. F., Leite, P. C. y Teixeira, L. M. (2007). Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102:853-859.
- Fraise, A. P. (2002). Susceptibility of antibiotic-resistant cocci to biocides. *J. Appl. Microbiol.* 92:158-62.
- Franz, C. M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W. y Gálvez, A. (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 151:125-40.
- Franz, C. M. A. P., Holzapfel, W. H. y Stiles, M. E. (1999). Enterococci at the crossroad of food science?. *J. Food Microbiol.* 47:1-24.
- Franz, C. M. P. A., Muscholl-Silberhorn, A. B., Yousif, N. M. K., Vancanneyt, M., Swings, J. y Holzapfel, W. H. (2001). Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4385-4389.
- Franz, C. M. A. P., Schillinger, U. y Holzapfel, W. H. (1996). Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. *Int. J. Food Microbiol.* 29:255-270.
- Franz, C. M. P. A., Stiles, M. E., Schleifer, K. H. y Holzapfel, W. H. (2003). Enterococci in foods-a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 88:105-122.
- Freitas, A. R., Tedim, A. P., Novais, C., Ruiz-Garbajosa, P., Werner, G., Laverde-Gomez, J. A., Cantón, R., Peixe, L., Baquero, F. y Coque, T. M. (2010). Global spread of the *hylEfm* colonization-virulence gene in megaplasms of the *Enterococcus faecium* CC17 polyclonal subcluster. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010 54(6):2660-2665.
- Fuglsang, A., Rattray, F. P., Nilsson, D. y Nyborg, N. C. B. (2003). Lactic acid bacteria: inhibition of angiotensin converting enzyme *in vitro* and *in vivo*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 83:27-34.
- Fukata, T., Hadate, Y., Baba, E. y Arakawa, A. (1991). Influence of bacteria on *Clostridium perfringens* infections in young chickens. *Avian Dis.* 35:224-227.
- Furushiro, M., Sawada, H., Hirai, K., Motoike, M., Sansawa, H., Kobayashi, S., Watanuki, M. y Yokokura, T. (1990). Blood pressure-lowering effect of extract from *Lactobacillus casei* in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Agric. Food Chem.* 54:2193-2198.
- Galloway-Peña, J. R., Bourgogne, A., Qin, X. y Murray, B. E. (2011). Diversity of the *fsr-gelE* region of the *Enterococcus faecalis* genome but conservation in strains with partial deletions of the *fsr* operon. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:442-451.
- Galloway-Peña, J., Roh, J. H., Latorre, M., Qin, X. y Murray, B. E. (2012). Genomic and SNP analyses demonstrate a distant separation of the hospital and community-associated clades of *Enterococcus faecium*. *PLoS ONE* 7(1), e31187. doi:10.1371/journal.pone.0030187.
- Gálvez, A., López, R. L., Abriouel, H., Valdivia, E. y Omar, N. B. (2008). Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* 28:125-152.
- Ganesan, B. y Weimer, B. C. (2007) Amino acid metabolism in relationship to cheese flavor development. En *Improving the flavour of cheese*, pp. 70-101. Editado por: Weimer, B.C. Woodhead Publishing & CRC Press. EEUU.
- Gaspar, F., Teixeira, N., Rigottier-Gois, L., Marujo, P., Nielsen- LeRoux, C., Crespo, M. T., Lopes, M. F. y Serró, P. (2009). Virulence of *Enterococcus faecalis* dairy strains in an insect model: the role of *fsrB* and *gelE*. *Microbiology* 155:3564-3571.
- Gasser, F. (1994). Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. *Bull. Inst. Pasteur.* 92:45-67.

- Gasser, B., Saloheimo, M., Rinas, U., Dragosits, M., Rodríguez Carmona, E., Baumann, K., Giuliani, M., Parrilli, E., Branduardi, P., Lang, C., Porro, D., Ferrer, P., Tutino, M. L., Mattanovich, D. y Villaverde, A. (2008). Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. *Microb. Cell Fact.* 7(11). doi: 10.1186/1475-2859-7-11.
- Geleijnse, J. M. y Engberink, M. F. (2010). Lactopeptides and human blood pressure. *Curr. Opin. Lipidol.* 21:58-63.
- Giannino, M. L., Marzotto, M., Dellaglio, F. y Feligni, M. (2009). Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture-independent methods. *Int. J. Food Microbiol.* 130:188-195.
- Gilbert, C., Atlan, D., Blanc, B., Portalier, R., Germond, G. J., Lapierre, L. y Mollet, B. (1996) A new cell surface proteinase: sequencing and analysis of the *prtB* gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *J. Bacteriol.* 178:3059-3065.
- Gilmore, M. S., Segarra, R. A., Booth, M. C., Bogie, C. P., Hall, L. R. y Clewell, D. B. (1994). Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J. Bacteriol.* 176:7335-7344.
- Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food. Microbiol.* 88:215-222.
- Giraffa, G. (2004). Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiol. Rev.* 28:251-260.
- Giraffa, G., Carminati, D. y Neviani, E. (1997). Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. *J. Food Prot.* 60:732-738.
- Gobbetti, M., Di Cagno, R. y De Angelis, M. (2010). Functional microorganisms for functional food quality. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 50:716-727.
- Gobbetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffredi, F. y Addeo, F. (2000). Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3898-3904.
- Gobbetti, M., Minervini, F. y Rizzello, C. G. (2004). Angiotensin-I-converting enzyme-inhibitory and microbial-bioactive peptides. *Int. J. Dairy Technol.* 57:173-187.
- Gobbetti, M., Stepaniak, L., De Angelis, M., Corsetti, A. y Cagno, R. D. (2002). Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 42:223-239.
- Gómez-Ruiz, J. A., Ramos, M., y Recio, I. (2002). Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *Int. Dairy J.* 12:697-706.
- Gómez-Ruiz, J. A., Ramos, M. y Recio, I. (2004). Identification and formation of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheese by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1054:269-277.
- Gómez-Ruiz, J. A., Ramos, M. y Recio, I. (2007). Identification of novel angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides from ovine milk proteins by CE-MS and chromatographic techniques. *Electrophoresis* 28:4202-4211.
- Gómez-Ruiz, J. A., Taborda, G., Amigo, L., Recio, I. y Ramos, M. (2006). Identification of ACE-inhibitory peptides in different Spanish cheeses by tandem mass spectrometry. *Eur. Food Res. Technol.* 223:595-601.
- Gómez-Sala, B. (2006). *M.Sc. Thesis*. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, Spain.
- Gonzalez-Gonzalez, C. R., Tuohy, K. M. y Jauregi, P. (2011). Production of angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk fermented with probiotic strains: Effect of calcium, pH and peptides on the ACE-inhibitory activity. *Int. Dairy Sci.* 221:615-622.
- Granato, P. A. y Jackson, R. W. (1969). Biocomponent nature of lysin from *Streptococcus zymogenes*. *J. Bacteriol.* 100:856-868.
- Guang, C. y Phillips, R. D. (2009). Plant food-derived angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *J. Agric. Food Chem.* 57:5113-5120.
- Guédon, E., Serron, P., Ehrlich, S. D., Renault, P. y Delorme, C. (2001). Pleiotropic transcriptional repressor CodY senses the intracellular pool of branched-chain amino acids in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* 40:1227-1239.
- Guédon, E., Sperandio, B. C., Pons, M., Ehrlich, S. D. y Renault, P. (2005). Overall control of nitrogen metabolism in *Lactococcus lactis* by CodY, and possible models for CodY regulation in Firmicutes. *Microbiology* 151:3895-3909.

- Guldtfeldt, L. U., Sørensen, K. I., Strøman, P., Behrndt, H., Williams, D. y Johansen, E. (2001). Effect of starter cultures with a genetically modified peptidolytic or lytic system on cheddar cheese ripening. *Int. Dairy J.* 11:373-382.
- Guo, Y., Pan, D., Zeng, X. y Tanokura, M. (2009). Purification and characterization of CEP from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. *Food Chem.* 112:533-538.
- Gutiérrez, J., Criado, R., Citti, R., Martín, M., Herranz, C., Fernández, F., Cintas, L. M. y Hernández, P. E. (2004). Performance and applications of polyclonal anti-peptide antibodies with specificity for the enterococcal bacteriocin enterocin P. *Agric. Food Chem.* 52:2247-2255.
- Gutiérrez, J., Larsen, R., Cintas, L. M., Kok, J. y Hernández, P. E. (2006). High-level heterologous production and functional expression of the sec-dependent enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72:41-51.
- Gútiéz, L., Gómez-Sala, B., Recio, I., del Campo, R., Cintas, L. M., Herranz, C. y Hernández, P. E. *Enterococcus faecalis* strains from food, environmental, and clinical origin produce ACE-inhibitory peptides and other bioactive peptides during growth in bovine skim milk, (Manuscript a under review).
- Gútiéz, L., Borrero, J., Jiménez, J. J., Gómez-Sala, B., Recio, I., Cintas, L. M., Herranz, C. y Hernández, P. E. Genetic and biochemical evidence that gelatinase (GelE) encoded by *Enterococcus faecalis* DBH18 produce bovine milk-derived hydrolysates with ACE-inhibitory activity, (Manuscript b under review).
- Gútiéz, L., Otte, J. A. H., Vogensen, F. K., Borrero, J., Arbulu, S., Cintas, L. M., Herranz, C. y Hernández, P. E. Heterologous expression of enterococcal proteases by lactic acid bacteria (LAB) and yeasts: *Lactobacillus casei* CECT475, expressing the gelatinase (GelE) from *Enterococcus faecalis* DBH18, releases ACE-inhibitory peptides (ACE-IP) during growth in bovine milk, (Manuscript c under review).
- Haas, W., Shepard, B. D. y Gilmore, M. S. (2002). Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. *Nature* 415:84-87.
- Habermann, W., Zimmermann, K., Skabaris, H., Kunze, R. y Rusch, V., (2002). Reduction of acute recurrence in patients with chronic recurrent hypertrophic sinusitis by treatment with a bacterial immunostimulant (*Enterococcus faecalis* bacteria of human origin). *Arzneimittelforschung* 52:622-627.
- Hagting, A., Kunji, E. R., Leenhouts, K. J., Poolman, B. y Konings, W. N. (1994). The di- and tripeptide transport protein of *Lactococcus lactis*. A new type of bacterial peptide transporter. *J. Biol. Chem.* 269: 11391-11399.
- Hamme, V., Sannier, F., Piot, J. M., y Bordenave-Juchereau, S. (2009a). Goat whey fermentation by *Kluyveromyces marxianus* and *Lactobacillus rhamnosus* release tryptophan and tryptophanlactokinin from a cryptic zone of alpha-lactalbumin. *J. Dairy Res.* 76:379-383.
- Hamme, V., Sannier, F., Plot, J. M., Didelot, S. y Bordenave-Juchereau, S. (2009b). Crude goat whey fermentation by *Kluyveromyces marxianus* and *Lactobacillus rhamnosus*: contribution to proteolysis and ACE inhibitory activity. *J. Dairy Res.* 76:152-157.
- Hancock, L. E. y Perego, M. (2004). The *Enterococcus faecalis* *fsr* two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. *J. Bacteriol.* 186:5629-5639.
- Harrington, S. M., Ross, T. L., Gebo, K. A. y Merz, W. G. (2004). Vancomycin resistance, *esp*, and strain relatedness: a 1-year study of enterococcal bacteremia. *J. Clin. Microbiol.* 42:5895-5898.
- Hartmann, R. y Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18:163-169.
- Hata, Y., Yamamoto, M., Ohni, M., Nakajima, K., Nakamura, Y. y Takano, T. (1996). Placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 64:767-771.
- Hayes, M., Stanton, C., Slattery, H., O'Sullivan, O., Hill, C., Fitzgerald, G. F. y Ross, R. P. (2007). Casein fermentate of *Lactobacillus animalis* DPC6134 contains a range of novel propeptide angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:4658-4667.
- Hebert, E. M., Mamone, G., Picariello, G., Raya, R. R., Savoy, G., Ferranti, P. y Addeo, F. (2008). Characterization of the pattern of α_{s1} - and α -casein breakdown and release of a bioactive peptide by a cell envelope proteinase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:3682-3689.

- Hebert, E. M., Raya, R. R. y de Giori, G. S. (2002). Modulation of the cell-surface proteinase activity of the thermophilic lactobacilli by the peptide supply. *Curr. Microbiol.* 49:385-389.
- Heikens, E., Bonten, M. J. M. y Willems, R. J. L. (2007). Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. *J. Bacteriol.* 189:8233-8240.
- Hendrickx, A. P. A., Willems, R. J. L., Bonten, M. J. M. y van Schaik, W. (2009). LPxTG surface proteins of enterococci. *Trends Microbiol.* 17:423-430.
- Henrich, B., Klein, J. R., Weber, B., Delorme, C., Renault, P. y Wegmann, U. (2002). Food-grade delivery system for controlled gene expression in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5429-5436.
- Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M. y Recio, I. (2002). Preparation of ovine and caprine β -lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine β -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. *Int. Dairy J.* 12:805-812.
- Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M. y Recio, I. (2004). Application of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the identification of biologically active peptides produced by milk fermentation and simulated gastrointestinal digestion. *J. Chromatogr. A.* 1049:107-114.
- Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Recio, I. y Bartolomé, B. (2007). ACE-inhibitory and radical-scavenging activity of peptides derived from beta-lactoglobulin f(19-25). Interactions with ascorbic acid. *J. Agric. Food Chem.* 55:3392-3397.
- Hernández-Ledesma, B., Contreras, M. M. y Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into food. *Adv. Colloid Interface Sci.* 165:23-35.
- Hickey, R. M., Ross, R. P. y Hill, C. (2004). Controlled autolysis and enzyme release in a recombinant lactococcal strain expressing the metalloendopeptidase Enterolysin A. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1744-1748.
- Hickey, R. M., Twomey, D. P., Ross, R. P. y Hill, C. (2003). Production of enterolysin A by a raw milk enterococcal isolate exhibiting multiple virulence factors. *Microbiology* 149:655-664.
- Higashide, T., Takahashi, M., Kobayashi, A., Ohkubo, S., Sakurai, M., Shirao, Y., Tamura, T. y Sugiyama, K. (2005). Endophthalmitis caused by *Enterococcus mundtii*. *J. Clin. Microbiol.* 43:1475-1476.
- Hirota, T., Ohki, K., Kawagishi, R., Kajimoto, Y., Mizuno, S., Nakamura, Y. y Kitakaze, M. (2007). Casein hydrolysate containing the antihypertensive tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro improves vascular endothelial function independent of blood pressure-lowering effects: Contribution of the inhibitory action of angiotensin-converting enzyme. *Hypertens. Res.* 30:489-496.
- Holck, A. y Naes, H. (1992). Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the cell-envelope-associated proteinase from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NCDO 151. *J. Gen. Microbiol.* 138:1353-1364.
- Holm, F. (2003). Gut health and diet: The benefits of probiotics and prebiotics on human health. *The world of ingredients* 2:52-55.
- Holo, H. y Nes, I. F. (1989). High-frequency transformation by electroporation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:3119-3123.
- Holzappel, W. H., Geisen, R. y Schillinger, U. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.* 24:343-362.
- Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. y Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73:365-373.
- Holzappel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U. y Huis in't Veld, J. H. J. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 41:85-101.
- Houlihan, A. J. y Russell, J. B. (2006). The effect of calcium and magnesium on the activity of bovicin HC5 and nisin. *Curr. Microbiol.* 53:365-369.
- Hugas, M., Garriga, M. y Aymerich, M. T. (2003). Functionality of enterococci in meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 88:223-233.
- Hummel, A. S., Holzappel, W. H. y Franz, C. M. A. P. (2007). Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. *Syst. Appl. Microbiol.* 30:1-7.
- Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A. y Rozès, N. (2010). Lactic acid bacteria from fermented table olives. *Food Microbiol.* 31:1-8.
- Idiris, A., Tohda, H., Kumaga, H. y Takegawa, K. (2010). Engineering of protein secretion in yeasts: strategies and impact on protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86:403-417.

- Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasao, M., Hayakawa, K., Kimura, M. y col. (2003). Blood-pressure lowering effect of a novel fermented milk containing [gamma]-aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *Eur. J. Clin. Nutr.* 57:490-495.
- Jack, R. W., Tagg, J. R. y Ray, B. (1995). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59:171-200.
- Jacob, A. y Hobbs, S. J. (1974). Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*. *J. Bacteriol.* 117:360-372.
- Jarrott, B., Drummer, O., Hooper, R., Anderson, A. I. E. Miach, P. J. y Louis, W. J. (1982). Pharmacokinetic properties of captopril after acute and chronic administration to hypertensive subjects. *Am. J. Cardiol.* 49:1547-1549.
- Jauhiainen, T. y Korpela, R. (2007). Milk peptides and blood pressure. *J. Nutr.* 3:825-829.
- Jauhiainen, T., Rönneck, M., Vapaatalo, H., Wuolle, K., Kautiainen, H. y Korpela, R. (2007). *Lactobacillus helveticus* fermented milk reduces arterial stiffness in hypertensive subjects. *Int. Dairy J.* 17:1209-1211.
- Je, J.-Y., Park, P.-J., Kwon, J.-Y. y Kim, S.-K. (2004). A novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* 52:7842-7845.
- Jenness, R., Larson, B. L., McMeekin, T. L., Swanson, A. M., Whitnah, C. H. y Whitney, R. M. (1956). Nomenclature of the proteins of bovine milk. *J. Dairy Sci.* 39:536-541.
- Jensen, R. G. (1995). Introduction. En *Handbook of milk composition*, pp. 1-3. Editado por: Jensen, R.G. Academic press. San Diego. California, Estados Unidos.
- Johansen, E. (2003). Challenges when transferring technology from *Lactococcus* laboratory strains to industrial strains. *Genet. Mol. Res.* 2:112-116.
- Jönsson, M., Saleihan, Z., Nes, I. F., y Holo, H. (2009). Construction and characterization of three lactate dehydrogenase-negative *Enterococcus faecalis* V583 mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:4901-4903.
- Juillard, V., Laan, H., Kunji, E. R. S., Jeronimus-Stratingh, C. M., Bruins, A. P. y Konings, W. N. (1995). The extracellular PI-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes β -casein into more than one hundred different oligopeptides. *J. Bacteriol.* 177:3472-3478.
- Karaki, H., Doi, K., Sugano, S., Uchiya, H., Sugai, R., Murakami, U. y Takemoto, S. (1990). Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats. *Comp. Biochem. Physiol.-C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 96:367-371.
- Katayama, K., Anggraeni, H. E., Mori, T., Ahmmed, A. A., Kawahara, S., Sugiyama, M. y col. (2008). Porcine skeletal muscle troponin is a good source of peptides with angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity and anti hypertensive effects in spontaneously hypertensive rats. *J. Agric. Food Chem.* 56:355-360.
- Kau, A. L., Ahern, P. P., Griffin, N. W., Goodman, A. L. y Gordon, J. I. (2012). Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature* 474:327-436.
- Kawalec, M., Potempa, J., Moon, J. L., Travis, J. y Murray, B. E. (2005). Molecular diversity of a putative virulence factor: purification and characterization of isoforms of an extracellular serine glutamyl endopeptidase of *Enterococcus faecalis* with different enzymatic activities. *J. Bacteriol.* 187:266-275.
- Kawase, M., Hashimoto, H., Hosoda, M., Morita, H. y Hosono, A. (2000). Effect of administration of fermented milk containing whey protein concentrate to rats and healthy men on serum lipids and blood pressure. *J. Dairy Sci.* 83:255-263.
- Kayser, F.H. (2003). Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int. J. Food Microbiol.* 88:255-262.
- Khan, H., Flint, S. y Yu, P. L. (2010). Enterocins in food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 141:1-10.
- Kilpi, E. E. R., Kahala, M. M., Steele, J. L., Pihlanto, A. M. y Joutsjoki, V. V. (2007). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in milk fermented by wild-type and peptidase-deletion derivatives of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *Int. Dairy J.* 17:976-984.
- Kim, J. H. y Mills, D. A. (2007). Improvement of a nisin-inducible expression vector for use in lactic acid bacteria. *Plasmid* 58:275-283.
- Kim, Y. G., Moon, J. T., Lee, K. M., Chon, N. R. y Park, H. (2006). The effects of probiotics on symptoms of irritable bowel syndrome. *Korean J. Gastroenterol.* 47:413-419.

- Klaenhammer, T. R. (1993). Genetic of bacteriocin produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12:39-86.
- Klaenhammer, T. R., Barrangou, R., Buck, B. L., Azcarate-Peril, M. A. y Altermann, E. (2005) Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:393-409.
- Klare, I., Werner, G. y Witte, W. (2001). Enterococci: habitats, infections, virulence factors, resistances to antibiotics, transfer of resistance determinants. En *Emerging bacterial pathogens. Contrib. Microbiol.*, vol. 8, pp. 108-122. Editado por: Mühldorfer, I. y Schäfer, K. P. Basel/Karger. Suiza.
- Klare, I., Konstabel, C., Badstübner, D., Werner, G. y Witte, W. (2003). Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int. J. Food Microbiol.* 88:269-290.
- Klein, G. (2003). Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *Int. J. Food Microbiol.* 88:123-131.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C. y Reuter, G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 41:103-25.
- Klostermann, K., Crispie, F., Flynn, J., Ross, R. P., Hill, C. y Meaney, W. (2008). Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* for treatment of bovine mastitis: comparison with antibiotic treatment in field trials. *J. Dairy Res.* 75:365-373.
- Koch, S., Hufnagel, M., Theilacker, C. y Huebner, J. (2004). Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine* 22:822-830.
- Kohan, D. E., Rossi, N. F., Inscho, E. W. y Pollock, D. M. (2011). Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin. *Physiol. Rev.* 91:1-77.
- Köhler, W. (2007). The present state of species within the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 297:133-150.
- Kok, J. y de Vos, W. M. (1994). The proteolytic system of lactic acid bacteria. En *Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria*, pp. 169-210. Editado por: Gasson, M., De Vos, W. Blackie Academic & Professional. Glasgow, Reino Unido.
- Kok, J., Leenhouts, K. J., Haandrikman, A. J., Ledebor, A. M. y Venema, G. (1988) Nucleotide sequence of the cell wall proteinase gene of *Streptococcus cremoris* Wg2. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:231-238.
- Konings, W. N., Kok, J., Kuipers, O. P. y Poolman, B. (2000). Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. *Curr. Opin. Microbiol.* 3:276-282.
- Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *J. Funct. Foods.* 1:177-187.
- Korhonen, H. y Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *Int. Dairy J.* 16:945-960.
- Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., De Ruyter, P. G. G. A., Luesink, E. J. y de Vos, M. W. (1995). Autorregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J. Biol. Chem.* 270:299-304.
- Kuipers, O. P., de Ruyter, P. G., Kleerevezem, M. y de Vos, W. M. (1998). Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.* 64:15-21.
- Kunji, E. R., Fang, G., Jeronimus-Stratingh, C. M., Bruins, A. P., Poolman, B., y Konings, W. N. (1998). Reconstruction of the proteolytic pathway for use of beta-casein by *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* 27:1107-1118.
- Kunji, E. R., Mierau, S., Hagting, A., Poolman, B. y Konings, W. N. (1996). The proteolytic system of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70:187-221.
- Ladero, V., Fernández, M., Calles-Enríquez, M., Sánchez-Llana, E., Cañedo, E., Martín, M. C. y Alvarez, M. A. (2012). Is the production of the biogenic amines tyramine and putrescine a species-level trait in enterococci? *Food Microbiol.* 30:132-138.
- Lamarque, M., Aubel, D., Piard, J., Gilbert, C., Juillard, V. y Atlan, D. (2011). The peptide transport system Opt is involved in both nutrition and environmental sensing during growth of *Lactococcus lactis* in milk. *Microbiology* 157:1612-1619.
- Lamml, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lavoie, J. L. y Sigmund, C. D. (2003). Minireview: Overview of the renin-angiotensin system-An endocrine and paracrine system. *Endocrinology* 144:2179-2183.
- Law, J. y Haandrikman, A. (1997) Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 7:1-11.

- Le Loir, Y., Azevedo, V., Oliveira, S., Freitas, D. A., Miyoshi, A., Bermúdez-Humarán, L. G., Nouaille, S., Ribeiro, L. A., Leclercq, S., Grabiell, J. E., Guimaraes, V. D., Oliveira, M. N., Charlier C., Gautier, M. y Langella, P. (2005). Protein secretion in *Lactococcus lactis*: an efficient way to increase the overall heterologous protein production. *Microb. Cell Fact.* 4:2.
- Leavis, H., Top, J., Shankar, N., Borgen, K., Bouten, M., van Embden, J. y Willems, R. J. L. (2004). A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *J. Bacteriol.* 186:672-682.
- Leclercq, H., Devriese, L. A. y Mossel, D. A. A. (1996). Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their uses as indicators of faecal contamination in drinking water. *J. Appl. Bacteriol.* 81:459-466.
- Leenhouts, K., Bolhuis, A., Venema, G. y Kok, J. (1998). Construction of a food-grade multicopy integration system for *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49:417-423.
- Lepage, E., Brinster, S., Caroin, C., Ducroix-Crepy, C., Rogottier-Gois, L., Dunny, G., Hennequet-Antier, C. y Serror, P. (2006). Comparative genomic hybridization analysis of *Enterococcus faecalis*: identification of genes absent from food strains. *J. Bacteriol.* 188:6858-6868.
- Leroy, F., Verluyten, J. y de Vuyst, L. (2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 106:270-285.
- Lewenstein, A., Frigerio, G. y Moroni, M. (1979). Biological properties of SF68, a new approach for the treatment of diarrhoeal diseases. *Curr. Ther. Res.* 26:967-981.
- Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:999-1007.
- Lewis, R. J. y Garcia, M. L. (2003). Therapeutic potential of venom peptides. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2:790-802.
- Li, G.-H., Lea, G.-W., Shi, Y.-H. y Shrestha, S. (2004). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutr. Res.* 24:469-486.
- Li, G.-H., Liu, H., Shi, Y.-H. y Le, G.-W. (2005). Direct spectrophotometric measurement of angiotensin I converting enzyme inhibitory activity for screening bioactive peptides. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 37:219-224.
- Linares, D. M., Kok, J. y Poolman, B. (2010). Genome sequences of *Lactococcus lactis* MG1363 (revised) and NZ9000 and comparative physiological studies. *J. Bacteriol.* 192:5806-5812.
- Lindgren, S. E. y Dobrogosz, W. J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* 87:149-164.
- Liu, M., Bayjanov, J. R., Renckens, B., Nauta, A. y Siezen, R. J. (2010). The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC Genomics* 11:36.
- Liu, C. Q., Su, P., Khunajakr, N., Deng, Y. M., Sumual, S., Kim, W. S., Tandianus, J. E. y Dunn, N. W. (2005). Development of food-grade cloning and expression vectors for *Lactococcus lactis*. *J. Appl. Microbiol.* 98:127-135.
- Ljungh, A. y Wadström, T. (2006). Lactic acid bacteria as probiotics. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 7:73-89.
- Lopez, M., Saenz, Y., Rojo-Bezares, B., Martinez, S., del Campo, R., Ruiz-Larrea, F., Zarazaga, M. y Torres, C. (2009). Detection of vanA and vanB2-containing enterococci from food samples in Spain, including *Enterococcus faecium* strains of CC17 and the new singleton ST425. *Int. J. Food Microbiol.* 133:172-178.
- López-Expósito, I., Quirós, A., Amigo, L. y Recio, I. (2007). Casein hydrolysates as a source of antimicrobial, antioxidant and antihypertensive peptides. *Lait* 87:241-249.
- López Expósito, I. y Recio, I. (2008). Protective effect of milk peptides: antibacterial and antitumor properties. *Adv. Exp. Med. Biol.* 606:271-293.
- López-Fandiño, R., Otte, J. y van Camp, J. (2006). Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *Int. Dairy J.* 16:1277-1293.
- Lowe, A. M., Lambert, P. A. y Smith, A. W. (1995). Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci. *Infect. Immun.* 63:703-706.
- MacEachern, P., Giannoccaro, J. P., Elsayed, S., Read, R. R. y Laupland, K. B. (2005). A rare case of pleuropulmonary infection and septic shock associated with *Enterococcus faecium* endocarditis. *J. Infect.* 50:84-88.

- Madureira, A. R., Tavares, T., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E. y Malcata, F. X. (2010). Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *J. Dairy Sci.* 8:437-455.
- Maeno, M., Yamamoto, N. y Takano, T. (1996). Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.* 79:1316-1321.
- Maguin, E., Prévost, H., Ehrlich, S. D. y Gruss, A. (1996). Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other Gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 178:931-935.
- Mäkinen, P., Clewell, D. B., An, F. y Mäkinen, K. K. (1989). Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metalloendopeptidase ("gelatinase") from *Streptococcus faecalis* (strain OG1-10.). *J. Biol. Chem.* 264:3325-3334.
- Mäkinen, P. y Mäkinen, K. K. (1994). The *Enterococcus faecalis* extracellular metalloendopeptidase (EC 3.4.24.30; coccolysin) inactivates human endothelin at bonds involving hydrophobic amino acid residues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200:981-985.
- Mancia, G., de Backer, G., Dominiczak, A., Cifkova, R., Fagard, R., Germano, G., Grassi, G., Heagerty, A. M., Kjeldsen, S. E., Laurent, S., Narkiewicz, K., Ruilope, L., Rynkiewicz, A., Schmieder, R. E., Struijker Boudier, H. A. J. y Zanchetti, A. (2007). Guidelines for the management of arterial hypertension the task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J. Hypertens.* 25:1105-1187.
- Mandlik, A., Swierczynski, A., Das, A. y Ton-That, H. (2008). Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends Microbiol.* 16(1):33-40.
- Mannu, L., Paba, A., Daga, E., Comunian, R., Zanetti, S., Duprè, I. y Sechi, L. A. (2003). Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *Int. J. Food Microbiol.* 88:291-304.
- Manso, M. A. y López-Fandiño, R. (2003). Angiotensin I converting enzyme-inhibitory activity of bovine, ovine, and caprine kappa-casein macropeptides and their tryptic hydrolysates. *J. Food Prot.* 66:1686-1692.
- Marothi, Y. A., Agnihotri, H. y Dubey, D. (2005). Enterococcal resistance: an overview. *Indian J. Med. Microbiol.* 23:214-219.
- Martín, M., Gutiérrez, J., Criado, R., Herranz, C., Cintas, L. M. y Hernández, P. E. (2006). Genes encoding bacteriocins and their expression and potential virulence factors of enterococci isolated from wood pigeons (*Columba palumbus*). *J. Food Prot.* 69:520-531.
- Martínez, S. (2003). Los enterococos en los alimentos: interés tecnológico y sanitario. *Alimentación: equipos y tecnología*.
- Martínez, J. M., Martínez, M. L., Suárez, A., Herranz, C., Casaus, P., Cintas, L. M., Rodríguez, L. M. y Hernández, P. E. (1998). Generation of polyclonal antibodies of predetermined specificity against pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4536-4545.
- Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., Recio, I. y Hernández-Ledesma, B. (2012). Antihypertensive peptides from proteins: a review. *Food Funct.* 3:350-361.
- Maruyama, S., Mitachi, H., Awaya, J., Kurono, M., Tomizuka, N. y Suzuki, H. (1987). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide of α_{s1} -casein. *Agric. Biol. Chem.* 51:2557-2561.
- Maruyama, S., Nakagomi, K., Tomizuka, N. y Suzuki, H. (1985). Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum rats. *Agric. Biol. Chem.* 49:1405-1409.
- Mathiesen, G., Sveen, A., Piard, J. C., Axelsson, L. y Eijssink, V. G. H. (2008). Heterologous protein secretion by *Lactobacillus plantarum* using homologous signal peptides. *J. Appl. Microbiol.* 105:215-226.
- Mathur, S. y Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review. *Int. J. Food Microbiol.* 105:281-295.
- McBride, S. M., Fischetti, V. A., LeBlanc, D. J., Moellering, R. C. y Gilmore, M. S. (2007). Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. *PloS One* 2. e582.
- McGowan, L. L., Jackson, C. R., Barrett, J. B., Hiott, L. M. y Fedorka-Cray, P. J. (2006). Prevalence and antimicrobial resistance of enterococci isolated from retail fruits, vegetables, and meats. *J. Food Prot.* 69:2976-2982.

- Meisel, H. (1997). Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers* 43:119-128.
- Meisel, H. (1998). Overview on milk protein-derived peptides. *Int. Dairy J.* 8:363-373.
- Meisel, H. (2004). Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *Biofactors* 21:55-61.
- Meisel, H., Walsh, D. J., Murray, B. y FitzGerald, R. J. (2006). ACE inhibitory peptides. En *Nutraceutical proteins and peptides in health and disease*, pp:269-315. Editad por: Yoshimori, M. y Shahidi, F. CRC Taylor and Francis. Boca Raton, Florida.
- Meyer, J., Bütikofer, U., Walther, B., Wechsler, D. y Sieber, R. (2009). Hot topic: changes in angiotensin-converting enzyme inhibition and concentrations of the tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro during ripening of different Swiss cheese varieties. *J. Dairy Sci.* 92:826-836.
- Mierau, I. y Kleerebezem, M. (2005). 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68:705-717.
- Miguel, M. y Aleixandre, A. (2006). Antihypertensive peptides derived from egg proteins. *J. Nutr.* 136:1457-1460.
- Miguel, M., Contreras, M. M., Recio, I. y Aleixandre, A. (2009). ACE-inhibitory and antihypertensive properties of a bovine casein hydrolysate. *Food Chem.* 112:211-214.
- Miguel, M., Gómez-Ruiz, J. A., Recio, I. y Aleixandre, A. (2010). Changes in arterial blood pressure after single oral administration of milk-casein-derived peptides in spontaneously hypertensive rats. *Mol. Nutr. Food Res.* 54:1-6.
- Miguel, M., Manso, M. A., López-Fandiño, R., Alonso, M. J. y Salaices, M. (2007). Vascular effects and antihypertensive properties of kappa-casein macropeptide. *Int. Dairy J.* 17:1473-1477.
- Miguel, M., Muguera, B., Sanchez, E., Delgado, M. A., Recio, I., Ramos, M. y Aleixandre, A. (2005). Changes in arterial blood pressure in hypertensive rats caused by long-term intake of milk fermented by *Enterococcus faecalis* CECT 5728. *Br. J. Nutr.* 94:36-43.
- Miguel, M., Recio, I., Gómez-Ruiz, J. A., Ramos, M. y López-Fandiño, R. (2004). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *J. Food Prot.* 67:1914-1920.
- Miguel, M., Recio, I., Ramos, M., Delgado, M. A. y Aleixandre, M. A. (2006). Antihypertensive effect of peptides obtained from *Enterococcus faecalis*-fermented milk in rats. *J. Dairy Sci.* 89:3352-3359.
- Mills, S., Ross, R. P., Hill, C., Fitzgerald, G. F. y Stanton, C. (2011). Milk intelligence: mining milk for bioactive substances associated with human health. *Int. Dairy J.* 21:377-401.
- Minervini, F., Algaron, F., Rizzello, C. G., Fox, P. F., Monnet, V. y Gobbetti, M. (2003). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5297-5305.
- Mizuno, S., Matsuura, K., Gotou, T., Nishimura, S., Kajimoto, O., Yabune, M., Kajimoto, Y. y Naoyuki, Y. (2005). Antihypertensive effect of casein hydrolysate in a placebo-controlled study in subjects with high-normal blood pressure and mild hypertension. *Br. J. Nutr.* 94:84-91.
- Mizuno, S., Nishimura, S., Matsuura, K., Gotou, T. y Yamamoto, N. (2004). Release of short and proline-rich antihypertensive peptides from casein hydrolysate with an *Aspergillus oryzae* protease. *J. Dairy Sci.* 87:3183-3188.
- Mohamed, J. A. y Murray, B. E. (2006). Influence of the *fsr* locus on biofilm formation by *Enterococcus faecalis* lacking *gelE*. *J. Med. Microbiol.* 55:1747-1750.
- Morrison, D., Woodford, N. y Cookson, B. (1997). Enterococci as emerging pathogens in humans. *J. Appl. Microbiol.* 83:89S-99S.
- Muguera, B., Ramos, M., Sánchez, E., Manso, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A., Delgado, M. A. y Recio, I. (2006). Antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk. *Int. Dairy J.* 16:61-69.
- Mullally, M. M., Meisel, H. y FitzGerald, R. J. (1997). Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine β -lactoglobulin. *FEBS Lett.* 402:99-101.
- Mundt, J. O. (1986). Genus *Enterococcus*. En: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2". Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. y Holt, J. G. (eds.). Williams and Wilkins Co., Baltimore. pp.1063-1065. Estados Unidos.

- Muñoz-Atienza, E., Landeta, G., de las Rivas, B., Gómez-Sala, B., Muñoz, R., Hernández, P. E., Cintas, L. M. y Herranz, C. (2011). Phenotypic and genetic evaluations of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from fish and fish products. *Int. J. of Food Microbiol.* 146:212-216.
- Muñoz-Tamayo, R., de Groot, J., Bakx, E., Wierenga, P. A., Gruppen, H., Zwietering, M. H. y Sijstma, L. (2011). Hydrolysis of β -casein by the cell-envelope-located P_I-type protease of *Lactococcus lactis*: a modelling approach. *Int. Dairy J.* 21:755-762.
- Murakami, M., Tonouchi, H., Takahashi, R., Kitazawa, H., Kawai, Y., Negishi, H. y Saito, T. (2004). Structural analysis of a new anti-hypertensive peptide (β -Lactosin B) isolated from a commercial whey product. *J. Dairy Sci.* 87:1967-1974.
- Murray, B. A. y Fitzgerald, R. J. (2007). Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: biochemistry, bioactivity and production. *Curr. Pharm. Des.* 13:773-791.
- Murray, B. A., Walsh, D. J. y FitzGerald, R. J. (2004). Modification of the furanacryloyl-L-phenylalanylglycylglycine assay for determination of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 59:127-137.
- Murray, B.E. (1990). The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 3:46-65.
- Nakajima, K., Hata, Y., Osono, Y., Hamura, M., Kobayashi, S. y Watanuki, M. (1995). Antihypertensive effect of extracts of *Lactobacillus casei* in patients with hypertension. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 18:181-187.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K. y Takano, T. (1995a). Purification and characterization of antitensin-I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *J. Dairy Sci.* 78:777-783.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K. y Takano, T. (1995b). Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors of angiotensin I-converting enzyme. *J. Dairy Sci.* 78:1253-1257.
- Nakayama, J., Cao, Y., Horii, T., Sakuda, S., Akkermans, A. D., de Vos, W. M. y Nagasawa, H. (2001a). Gelatinase biosynthesis-activating pheromone: a peptide lactone that mediates a *quorum sensing* in *Enterococcus faecalis*. *Mol. Microbiol.* 41:145-154.
- Nakayama, J., Cao, Y., Horii, T., Sakuda, S. y Nagasawa, H. (2001b). Chemical synthesis and biological activity of the gelatinase biosynthesis-activating pheromone of *Enterococcus faecalis* and its analogs. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65:2322-2325.
- Nakayama, J., Chen, S., Oyama, N., Nishiguchi, K., Azab, E. A., Tanaka, E., Kariyama, R. y Sonomoto, K. (2006). Revised model for *Enterococcus faecalis* *fsr* quorum-sensing system: the small open reading frame *fsrD* encodes the gelatinase biosynthesis-activating pheromone propeptide corresponding to staphylococcal AgrD. *J. Bacteriol.* 188:8321-8326.
- Nakayama, J., Kariyama, R. y Kumon, H. (2002). Description of a 23.9-Kilobase chromosomal deletion containing a region encoding *fsr* genes which mainly determines the gelatinase-negative phenotype of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* in urine. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3152-3155.
- Nallapareddy, S. R., Singh, K. V., Duh, R. W., Weinstock, G. M. y Murray, B. E. (2000a). Diversity of *ace*, a gene encoding a microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules, from different strains of *Enterococcus faecalis* and evidence for production of ACE during human infections. *Infect. Immun.* 68:5210-5217.
- Nallapareddy, S. R., Qin, X., Weinstock, G. M., Höök, M. y Murray, B. E. (2000b). *Enterococcus faecalis* adhesin, *ace*, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. *Infect. Immun.* 68:5218-5224.
- Nallapareddy, S. R., Singh, K. V., Okhuysen, P. C. y Murray, B. E. (2008). A functional collagen adhesion gene, *acm*, in clinical isolates of *Enterococcus faecium* correlates with the recent success of this emerging nosocomial pathogen. *Infect. Immun.* 76:4110-4119.
- Nallapareddy, S. R., Weinstock, G. M. y Murray, B. E., (2003). Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by *Acm*, a new member of the MSCRAMM family. *Mol. Microbiol.* 47:1733-1747.
- Nes, I. F., Diep, D. B., Håvarstein, L. S., Brurberg, M. B., Eijsink, V. G. y Holo, H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70:113-128.
- Nguyen, T. D. T., Kang, J. H. y Lee, M. S. (2007). Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *Int. J. Food Microbiol.* 113:358-361.

- Nielsen, M. S., Martinussen, T., Flambard, B., Sørensen, K. I. y Otte, J. (2009). Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: Effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. *Int. Dairy J.* 19:155-165.
- Nilsen, T., Nes, I. y Holo, H. (2003). Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2975-2984.
- Nishiguchi, K., Nagata, K., Tanokura, M., Sonomoto, K. y Nakayama, J. (2009). Structure-activity relationship of gelatinase biosynthesis-activating pheromone of *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 191:641-650.
- Nouaille, S., Ribeiro, L. A., Miyoshi, A., Pontes, D., Le Loir, Y., Oliveira, S. C., Langella, P. y Azevedo, V. (2003). Heterologous production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet. Mol. Res.* 2:102-111.
- Nurminen, M.-L., Sipola, M., Kaarto, H., Pihlanto-Leppala, A., Piilola, K., Korpela, R. y col. (2000). α -lactorphan lowers blood pressure measured by radiotelemetry in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* 66:1535-1543.
- Ogier, J.-C., Casalta, E., Farrokh, C. y Saïdi, A. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126:286-290.
- Ogier, J.-C. y Serror, P. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126:291-301.
- Ohmomo, S., Murata, S., Katayama, N., Nitisinprasart, S., Kobayashi, M., Nakajima, T., Yajima, M. y Nakanishi, K. (2000). Purification and some characteristics of enterocin ON-157, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NIAI 157. *J. Appl. Microbiol.* 88:81-89.
- Ondetti, M. A. y Cushman, D. W. (1982). Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Annu. Rev. Biochem.* 51:283-308.
- Ortiz-Chao, P., Gomez-Ruiz, J. A., Rastall, R. A., Mills, D., Cramer, R., Pihlanto, A., Korhonen, H. y Jauregi, P. (2009). Production of novel ACE inhibitory peptides from β -lactoglobulin using Protease N Amano. *Int. Dairy J.* 19:69-76.
- O'Sullivan, L., Ross, R. P. y Hill, C. (2002). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie.* 84: 593-604.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B. y Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:49-79.
- Otte, J., Lenhard, T., Flambard, B. y Sørensen, K. I. (2011). Influence of fermentation temperature and autolysis on ACE-inhibitory activity and peptide profiles of milk fermented by selected strains of *Lactobacillus helveticus* and *Lactococcus lactis*. *Int. Dairy J.* 21:229-238.
- Otte, J., Shalaby, S. M. A., Zakora, M. y Nielsen, M. S. (2007a). Fractionation and identification of ACE-inhibitory peptides from α -lactalbumin and β -casein produced by thermolysin-catalysed hydrolysis. *Int. Dairy J.* 17:1460-1472.
- Otte, J., Shalaby, S. M., Zacora, M., Pripp, A. H. y El-Shabrani, S. A. (2007b). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk proteins hydrolysates: Effect of substrate, enzyme and time of hydrolysis. *Int. Dairy J.* 17:488-503.
- Owings, W. J., Reynolds, D. L., Hasiak, R. J. y Ferket, P. R. (1990). Influence of dietary supplementation with *Streptococcus faecium* M-74 on broiler body weight, feed conversion, carcass characteristics, and intestinal microbial colonization. *Poultry Sci.* 69:1257-1264.
- Papadimitriou, C. G., Vafopoulou-Mastrogiannaki, A., Silva, S. V., Gomes, A.-M., Malcata, F. X. y Alichanidis, E. (2007). Identification of peptides in traditional and probiotic sheep milk yoghurt with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Food Chem.* 105:647-656.
- Park, S. Y., Kim, K. M., Lee, J. H., Seo, S. J. y Lee, I. H. (2007). Extracellular gelatinase of *Enterococcus faecalis* destroys a defense system in insect hemolymph and human serum. *Infect. Immun.* 75:1861-1869.
- Park, S. Y., Shin, Y. P., Kim, C. H., Park, H. J., Seong, Y. S., Kim, B. S., Seo, S. J. y Lee, I. H. (2008). Immune evasion of *Enterococcus faecalis* by an extracellular gelatinase that cleaves C3 and iC3b. *J. Immunol.* 181:6328-6336.
- Parsek, M. R. y Singh, P. K. (2003). Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:677-701.

- Pastar, I., Tonic, I., Golic, N., Kojic, M., van Kranenburg, R., Kleerebezem, M., Topisirovic, L. y Jovanovic, G. (2003) Identification and genetic characterization of a novel proteinase, PrtR, from the human isolate *Lactobacillus rhamnosus* BGT10. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5802-5811.
- Pederson, J. A., Mileski, G. J., Weimer, B. C. y Steele, J. L. (1999). Genetic characterization of a cell envelope-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *J. Bacteriol.* 181:4592-4597.
- Pessione, A., Lamberti, C., Coccolin, L., Campolongo, S., Grunau, A., Giubergia, S., Eberl, L., Riedel, K. y Pessione, E. (2012). Different protein expression profiles in cheese and clinical isolates of *Enterococcus faecalis* revealed by proteomic analysis. *Proteomics* 12:431-447.
- Petranovic, D., Guédon, E., Sperandio, B., Delorme, C., Ehrlich, D. y Renault, P. (2004). Intracellular effectors regulating the activity of the *Lactococcus lactis* CodY pleiotropic transcription regulator. *Mol. Microbiol.* 53: 613-621.
- Phelan, M. y Kerins, D. (2011). The potential role of milk-derived peptides in cardiovascular disease. *Food Funct.* 2:153-167.
- Picón, A., García-Casado, M. A. y Nuñez, M. (2010). Proteolytic activities, peptide utilization and oligopeptide transport systems of wild *Lactococcus lactis* strains. *Int. Dairy J.* 20:156-162.
- Pihlanto, A., Virtanen, T. y Korhonen, H. (2010). Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. *Int. Dairy J.* 20:3-10.
- Pihlanto-Leppälä, A. (2001). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace inhibitory peptides. *Trends Food Sci. Technol.* 11:347-356.
- Pihlanto-Leppälä, A., Koskinen, P., Tupasela, T. y Korhonen, H. (2000). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *J. Dairy Res.* 67:53-64.
- Pihlanto-Leppälä, A., Rokka, T. y Korhonen, H. (1998). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from bovine milk proteins. *Int. Dairy J.* 8:325-331.
- Pillar, C. M. y Gilmore, M. S. (2004). Enterococcal virulence-pathogenicity island of *Enterococcus faecalis*. *Front. Biosci.* 9:2335-2346.
- Pina, A. S. y Roque, A. C. A. (2009). Studies on the molecular recognition between bioactive peptides and angiotensin converting enzyme. *J. Mol. Recognit.* 22:162-168.
- Pins, J. J. y Keenan, J. M. (2006). Effects of whey peptides on cardiovascular disease risk factors. *J. Clin. Hypertens.* 8:775-782.
- Ponstein-Simarro Doorten, A. Y., vd Wiel, J. A. G., Jonker, D. (2009). Safety evaluation of an IPP tripeptide containing milk protein hydrolysate. *Food Chem. Toxicol.* 4:55-61.
- Poyart, C., Lambert, T., Morand, P., Abassade, P., Quesne, G., Baudouy, Y. y Trieu-Cuot, P. (2002). Native valve endocarditis due to *Enterococcus hirae*. *J. Clin. Microbiol.* 40:2689-2690.
- Prupp, A. H. (2008). Effect of peptides derived from food proteins on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Food Nutr. Res.* 52. En foodandnutritionresearch.net/index.php/fnr/article/view/1641/1525.
- Prupp, A. H., Isaksson, T., Stepaniak, L. y Sørhaug, T. (2004). Quantitative structure-activity relationship modelling of ACE-inhibitory peptides derived from milk proteins. *Eur. Food Res. Technol.* 219:579-583.
- Prupp, A. H., Sørensen, R., Stepamak, L. y Sørhaug, T. (2006). Relationship between proteolysis and angiotensin-I-converting enzyme inhibition in different cheeses. *LWT-Food Sci. Technol.* 39:677-683.
- Qi, P. X. (2007). Studies of casein micelle structure: the past and the present. *Lait* 87:363-383.
- Qin, X., Singh, K. V., Weinstock, G. M. y Murray, B. E. (2000). Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infect. Immun.* 68:2579-2586.
- Qin, X., Singh, K. V., Weinstock, G. M. y Murray, B. E. (2001). Characterization of *fsr*, a regulator controlling expression of gelatinase and serine protease in *Enterococcus faecalis* OG1RF. *J. Bacteriol.* 183:3372-3382.
- Quirós, A., Contreras, M.M., Ramos, M., Amigo, L. y Recio, I. (2009). Stability to gastrointestinal enzymes and structure-activity relationship of β -casein-peptides with antihypertensive properties. *Peptides* 30:1848-1853.
- Quirós, A., Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Amigo, L. y Recio, I. (2005). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir. *J. Dairy Sci.* 88:3480-3487.

- Quirós, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A. y Recio, I. (2006). Determination of the antihypertensive peptide LHLPLP in fermented milk by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Dairy. Sci.* 89:4527-4535.
- Quirós, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A. y Recio, I. (2007). Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *Int. Dairy J.* 17:33-41.
- Raghavan, S. y Kristinsson, H. (2009). ACEI-activity of tilapia protein hydrolysates. *Food Chem.* 117:582-588.
- Ramchandran, L. y Shah, N. P. (2008). Proteolytic profiles and angiotensin-I converting enzyme and α -glucosidase inhibitory activities of selected acid bacteria. *J. Food Sci.* 73:75-81.
- Rappsilber, J., Ishihama, Y. y Mann, M. (2003). Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal. Chem.* 75:663-670.
- Recio, I., Quirós, A., Hernández-Ledesma, B., Gómez-Ruiz, J. A., Miguel, M., Amigo, I., López-Expósito, I., Ramos, M. y Aleixandre, M. A. (2005). European Patent 200501373.
- Regazzo, D., Da Dalt, L., Lombardi, A., Andrighetto, A., Negro, A., Gabai, G. (2010). Fermented milks from *Enterococcus faecalis* TH563 and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LA2 manifest different degrees of ACE-inhibitory and immunomodulatory activities. *Dairy Sci. Technol.* 90:469-476.
- Reglamento (CE) n.º 1831/2003 del Parlamento europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, sobre los aditivos en la alimentación animal. DOUE n.º 268, de 18 de octubre de 2003.
- Reglamento (CE) n.º 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. DOUE n.º 404, de 30 de diciembre de 2006.
- Reglamento (CE) n.º 432/2012 de la Comisión de 16 de mayo de 2012 por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños. DOUE n.º 136, de 25 de mayo de 2012.
- Rich, R. L., Kreikemeyer, B., Owens, R. T., LaBrenz, S., Narayana, S. V. L., Weinstock, G. M., Murray, B. E. y Höök, M. (1999). Ace is a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. *J. Biol. Chem.* 274:26939-26945.
- Rival, S. G., Boeriu, C. G., y Wichers, H. J. (2001). Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *J. Agric. Food Chem.* 49:295-302.
- Robert, M. C., Razaname, A., Mutter, M. y Juillerat, M. A. (2004). Peptides derived from sodium caseinate hydrolysates produced by *Lactobacillus helveticus* NCC 2765. *J. Agric. Food Chem.* 52:6923-6931.
- Roberts, S. B. y Rosenberg, I. (2006). Nutrition and aging: changes in the regulation of energy metabolism with aging. *Physiol. Rev.* 86:651-667.
- Rochat, T., Bermúdez-Humarán, L., Gratadoux, J. J., Fourage, C., Hoebler, C., Corthier, G. y Langella, P. (2007). Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus casei* BL23 producing or not a manganese-dependant catalase on DSS-induced colitis in mice. *Microb. Cell Fact.* 6:2859-6-22.
- Rojas-Ronquillo, R., Cruz-Guerrero, A., Flores-Nájera, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., Reyes-Grajeda, J. P., Jiménez-Guzmán, J. y García-Garibay, M. (2012). Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota. *Int. Dairy J.* 26:147-154.
- Rokka, T., Syväoja, E. L., Tuominen, J. y Korhonen, H. (1997). Release of bioactive peptides by enzymatic proteolysis of *Lactobacillus* GG fermented UHT milk. *Milchwissenschaft* 52:675-678.
- Ross, R. P., Morgan, S. y Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* 79:3-16.
- Rud, I., Jensen, P. R., Naterstad, K. y Axelsson, L. (2006). A synthetic promoter library for constitutive gene expression in *Lactobacillus plantarum*. *Microbiology* 152:1011-1019.
- Ruiz-Garbajosa, P., Coque, T. M., Cantón, R., Willems, R. J. L., Baquero, F. y del Campo, R. (2007). Los complejos clonales de alto riesgo CC2 y CC9 están ampliamente representados en cepas hospitalarias de *Enterococcus faecalis* aisladas en España. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 25:513-518.
- Ruiz-Garbajosa, P., Bonten, M. J., Robinson, D. A., Top, J., Nallapareddy, S. R., Torres, C., Coque, T. M., Canton, R., Baquero, F., Murray, B. E., del Campo, R. y Willems, R. J. (2006). Multilocus sequence

- typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of evolution. *J. Clin. Microbiol.* 44:2220-2228.
- Ruoff, K. L. (1990). Recent taxonomic changes in the genus *Enterococcus*. *Curr. Topic Rev.* 9:75-79.
- Ryan, J. T., Ross, R. P., Bolton, D., Fitzgerald, G. F. y Stanton, C. (2011). Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. *Nutrients* 3:765-791.
- Ryhänen, E. L., Pihlanto-Leppälä, A. y Pakkala, E. (2001). A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. *Int. Dairy J.* 11:441-447.
- Sadat-Mekmene, L., Jardin, J., Corre, C., Mollé, D., Richoux, R., Delage, M. M., Lortal, S. y Gagnaire V. (2011). Simultaneous presence of PrtH and PrtH2 proteinases in *Lactobacillus helveticus* strains improves breakdown of the pure α_{s1} -casein. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:179-186.
- Sahm, D. F., Kissinger, J., Gilmore, M. S., Murray, P. R., Mulder, R., Solliday, J. y Clarke, B. (1989). *In vitro* susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 133:1588-1591.
- Saito, T. (2008). Antihypertensive peptides derived from bovine casein and whey proteins. *Adv. Exp. Med. Bio.* 606:295-317.
- Saito, T., Abubakar, A., Itoh, T., Arai, I. y Aimar, M. V. (1997). Development of a new type of fermented cheese whey beverage with inhibitory effects against angiotensin-converting enzyme. *Tohoku J. Agric. Res.* 48:15-23.
- Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y. e Itoh, T. (2000). Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *J. Dairy Sci.* 83:1434-1440.
- Sánchez, D., Kassan, M., Contreras, M. M., Carrión, R., Recio, I., Montero, M. J. y Sevilla, M. A. (2011). Long-term intake of a milk casein hydrolysate attenuates the development of hypertension and involves cardiovascular benefits. *Pharmacol. Res.* 63:398-404.
- Sánchez, J. (2008). Aspectos higiénicos, seguridad y potencial biotecnológico de enterococs aislados de ánades reales (*Anas platyrhynchos*). Caracterización bioquímica y genética de sus bacteriocinas y producción heteróloga en diversos hospedadores. *Tesis doctoral*. Universidad Complutense de Madrid.
- Sánchez, J., Basanta, A., Gómez-Sala, B., Herranz, C., Cintas, L. M. y Hernández, P. E. (2007). Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Int. J. Food Microbiol.* 117:295-305.
- Sanders, J. W., Venema, G. y Kok, J. (1997). A chloride-inducible gene expression cassette and its use in induced lysis of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3757-3763.
- Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M. D., Rea, M. C., Lombardi, A., Cogan, T. M., Kalantzopoulos, G. y Tsakalidou, E. (2001). Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *Int. Dairy J.* 11:621-647.
- Sartingen, S., Rozdzinski, E., Muscholl-Silberhorn, A. y Marre, R. (2000). Aggregation substance increases adherence and internalization, but no translocation, of *Enterococcus faecalis* through different intestinal epithelial cells in vitro. *Infect. Immun.* 68:6044-6047.
- Savijoki, K., Ingmer, H., y Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71:394-406.
- Savoia, C., Volpe, M., Alonzo, A., Rossi, C. y Rubattu, S. (2010). Natriuretic peptides and cardiovascular damage in the metabolic syndrome: molecular mechanisms and clinical implications. *Clin. Sci.* 118(4):231-240.
- Sayas-Barberá, E., Viuda-Martos, M., Fernández-López, F. Pérez-Alvarez, J. A. y Sendra, E. (2012). Combined use of a probiotic culture and citrus fiber in a traditional sausage "Longaniza de Pascua". *Food Control* 27:343-350.
- Schleifer, K. H. y Kilpper-Balz, R. (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* norn. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34:31-34.
- Schrör, K. (1992). Role of prostaglandins in the cardiovascular effects of bradykinin and angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J. Cardio. Pharm.* 20: 568-573.
- Schwager, S. L., Carmona, A. K. y Sturrock, E. D. (2006). A high-throughput fluorimetric assay for angiotensin I-converting enzyme. *Nat. Protoc.* 1:1961-1964.

- Semedo, T., Santos, M. A., Martins, P., Lopes, M. F. S., Marqués, J. J. F., Tenreiro, R. y Crespo, M. T. B. (2003). Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine haemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 41:2569-2576.
- Sentandreu, M. A. y Toldra, F. (2006a). A fluorescence-based protocol for quantifying angiotensin-converting enzyme activity. *Nat. Protoc.* 1:2423-2427.
- Sentandreu, M. A. y Toldra, F. (2006b). A rapid, simple and sensitive fluorescence method for the assay of angiotensin-I converting enzyme. *Food Chem.* 97:546-554.
- Seppo, L., Kerojoki, O., Suomalainen, T. y Korpela, R. (2002). The effect of a *Lactobacillus helveticus* LBK-16H fermented milk on hypertension- a pilot study on humans. *Milchwissenschaft* 57:124-127.
- Seppo, L., Jauhiainen, T., Poussa, T. y Korpela, R. A. (2003). A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 77:326-330.
- Sgorbati, B., Bivati, B. y Palenzona, D. (1995). The genus *Bifidobacterium*. En *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, pp. 279-376. Editado por: Wood, B. J. B. y Holzapfel, W. H. Blackie Academic & Professional. Londres, Reino Unido.
- Shalaby, S. M., Zakora, M. y Otte, J. (2006). Performance of two commonly used angiotensin-converting enzyme inhibition assays using FA-PGG and HHL as substrates. *J. Dairy Res.* 73:178-186.
- Shankar, N., Baghdayan, A. S. y Gilmore, M. S. (2002). Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature* 417:746-750.
- Shankar, N., Baghdayan, A. S., Huycke, M. M., Lindahl, G. y Gilmore, M. S. (1999). Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect. Immun.* 67:193-200.
- Shankar, N., Coburn, P., Pillar, C., Haas, W. y Gilmore, M. S. (2004). Enterococcal cytolysin: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island. *Int. J. Med. Microbiol.* 293:609-618.
- Shankar, N., Lockatell, C. V., Baghdayan, A. S., Drachenberg, C., Gilmore, M. S. y Johnson, D. E. (2001). Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infect. Immun.* 69:4366-4372.
- Sherwood, N. P., Russell, B. E., Jay, A. R. y Bowman, K. (1949). Studies on streptococci: III. New antibiotic substances produced by beta haemolytic streptococci. *J. Infect. Dis.* 84:88-91.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V. y Mann, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* 1: 2856-2860.
- Shihabi, Z. K. (1999). Analysis of angiotensin-converting enzyme by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 853:185-188.
- Shivers, R. P. y Sonenshein, A. L. (2004). Activation of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY by direct interaction with branched-chain amino acids. *Mol. Microbiol.* 53:599-611.
- Shuangquan, T. H. y Miyamoto, T. (2008). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in skim milk fermented with *Lactobacillus helveticus* 130B4 from camel milk in Inner Mongolia, China. *J. Sci. Food Agric.* 88:2688-2692.
- Siezen, R. J. (1999) Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76:139-155.
- Siezen, R. J., Kok, J., Abee, T. y Schaafsma, G. (2002) Lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82:1-4.
- Sifri, C. D., Mylonakis, E., Singh, K. V., Qin, X., Garsin, D. A., Murray, B. E., Ausubel, F. M. y Calderwood, S. B. (2002). Virulence effect of *Enterococcus faecalis* protease genes and the quorum-sensing locus *fsr* in *Caenorhabditis elegans* and mice. *Infect. Immun.* 70:5647-5650.
- Silva, S. V., Pihlanto, A. y Malcata, F. X. (2006). Bioactive peptides in ovine and caprine cheeselike systems prepared with proteases from *Cynara cardunculus*. *J. Dairy Sci.* 89:3336-3344.
- Silva Lopes, M. F., Simoes, A. P., Tenreiro, R., Figueiredo Marques, J. J. y Barreto Crespo, M. T. (2006). Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. *Int. J. Food Microbiol.* 112:208-214.
- Simoes-Barbosa, A., Abreu, H., Silva Neto, A., Gruss, A. y Langella, P. (2004). A food-grade delivery system for *Lactococcus lactis* and evaluation of inducible gene expression. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65:61-67.
- Simpson, W. J. y Taguchi, H. (1995). The genus *Pediococcus*, with notes on the genera *Tetragenococcus* and *Aerococcus*. En *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, pp. 125-172. Editado por: Wood, B. J. B. y Holzapfel, W. H. Blackie Academic & Professional. London, Reino Unido.

- Singh, K. V., Nallapareddy, S. R., Nannini, E. C., y Murray, B. E. (2005). Fsr-independent production of protease(s) may explain the lack of attenuation of an *Enterococcus faecalis* *fsr* mutant versus a *gelE-sprE* mutant in induction of endocarditis. *Infect. Immun.* 73:4888-4894.
- Singh, K. V., Qin, X., Weinstock, G. M. y Murray, B. E. (1998). Generation and testing of mutants of *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model. *J. Infect. Dis.* 178:1416-1420.
- Skaugen, M., Cintas, L. M. y Nes, I. F. (2003). Genetics of bacteriocin production in lactic acid bacteria. En *Genetics of Lactic Acid Bacteria*, pp. 225-260. Editado por: Wood, B. J. B. y Warner, P. Kluwer Academic/Plenum Publishers. Estados Unidos.
- Skeggs, L. T., Kahan, J. E. y Sumway, N. P. (1956). The preparation and function of the angiotensin-converting enzyme. *J. Exp. Med.* 103:295-299.
- Smacchi, E. y Gobetti, M. (1998). Peptides from several Italian cheeses inhibitory to proteolytic enzymes of lactic acid bacteria, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 and to the angiotensin I-converting enzyme. *Enzyme Microb. Technol.* 22:687-694.
- Smacchi, E., y Gobetti, M. (2000). Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiol.* 17:129-141.
- Smeianov, V. V., Wechter, V. P., Broadbent, J. R., Hughes, J. E., Rodriguez, B. T., Christensen, T. K., Ardo, Y. y Steele, J. L. (2007). Comparative high density microarray analysis of gene expression during growth of *Lactococcus helveticus* in milk versus rich culture medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:2661-2672.
- Smit, G., Smit, B. A. y Engels, W. J. M. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavor profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:591-610.
- Sohier, D., Berthier, F. y Reitz, J. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: Bacterial taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 126:267-270.
- Solheim, M., Brekke, M. C., Snipen, L. G., Willems, R. J., Nes, I. F. y Brede, D. A. (2011). Comparative genomic analysis reveals significant enrichment of mobile genetic elements and genes encoding surface-structure proteins in hospital-associated clonal-complex 2 *Enterococcus faecalis*. *BMC Microbiol.* 11:3.
- Sonenshein, A. L. (2005). CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 8:203-207.
- Sparo, M. D., Castro, M. S., Andino, P. J., Lavigne, M. V., Ceriani, C., Gutiérrez, G. L., Fernández, M. M., de Marzi, M. C., Malchiodi, E. L. y Manghi, M. A. (2006). Partial characterization of enterocin MR99 from a corn silage isolate of *Enterococcus faecalis*. *J. Appl. Microbiol.* 100:123-134.
- Sridhar, V. R., Smaianov, V. V. y Steele, J. L. (2006). Construction and evaluation of food-grade vectors for *Lactococcus lactis* using aspartate aminotransferase and α -galactosidase as selectable markers. *J. Appl. Microbiol.* 101:161-171.
- Steck, N., Hoffmann, M., Sava, I. G., Kim, S. C., Hahne, H., Tonkonogy, S. L., Mair, K., Krueger, D., Pruteanu, M. y otros autores. (2011). *Enterococcus faecalis* metalloprotease compromises epithelial barrier and contributes to intestinal inflammation. *Gastroenterology* 141:959-971.
- Stefanova, T., Urshev, Z., Dimitrov, Z., Fatchikova, N. y Minkova, S. (2009). Species affiliation of dairy lactobacilli with angiotensin converting enzyme inhibitory activity. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 23:1250-1254.
- Steinkraus, K. H. (2002). Fermentations in world food processing. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.* 1:23-32.
- Stepanovic, S., Jovanovic, M., Lavadinovic, L., Stosovic, B. y Pelemis, M. (2004). *Enterococcus durans* endocarditis in a patient with transposition of the great vessels. *J. Med. Microbiol.* 53:259-261.
- Stiles, M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70:331-345.
- Stiles, M. E. y Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36:1-29.
- Su, Y. A., Sulavik, M. C., He, P., Mäkinen, K. K., Mäkinen, P. L., Fiedler, S., Wirth, R. y Clewell, D. B. (1991). Nucleotide sequence of the gelatinase gene (*gelE*) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. *Infect. Immun.* 59:415-420.
- Süßmuth, S. D., Muscholl-Silberhorn, A., Wirth, R., Susa, M., Marre, R. y Rozdzinski, E. (2002). Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst. *Infect. Immun.* 68:4900-4906.

- Sureshkumar, K. K. (2008). Renin inhibition with aliskiren in hypertension: focus on aliskiren/hydrochlorothiazide combination therapy. *Vasc. Health Risk Manag.* 4:1205-1220.
- Suzzi, G., Lombardi, A., Lanorte, M. T., Caruso, M., Andrighetto, C. y Gardini, F. (2000). Characterization of autochthonous enterococci isolated from Semicotto Caprino Cheese, a traditional cheese produced in Southern Italy. *J. Appl. Microbiol.* 89:267-274.
- Švec, P., Ševčíková, A., Sedláček, I., Bednářová, J., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Vandamme, P. y Vancanneyt, M. (2007). Identification of lactic acid bacteria isolated from human blood cultures. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 49:192-196.
- Takala, T. M. y Saris, P. E. J. (2002). A food-grade cloning vector for lactic acid bacteria based on the nisin immunity gene *nisI*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59:467-471.
- Tauzin, J., Miclo, L. y Gaillard, J.-L. (2002). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine α_{s2} -casein. *FEBS Lett.* 531:369-374.
- Teixeira, N., Santos, S., Marujo, P., Yokohata, R., Iyer, V. S., Nakayama, J., Hancock, L. E., Serror, P. y Silva Lopes, M. F. (2012). The incongruent gelatinase genotype and phenotype in *Enterococcus faecalis* are due to shutting off the ability to respond to the gelatinase biosynthesis-activating pheromone (GBAP) quorum-sensing signal. *Microbiology* 158:519-528.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H. y Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33:2233-2239.
- Teuber, M. (1995). The genus *Lactococcus*. En *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, pp. 173-234. Editado por: Wood, B. J. B. y Holzapfel, W. H. Blackie Academic & Professional. Londres, Reino Unido.
- Thomas, V. C., Hiromasa, Y., Harms, N., Thurlow, L., Tomich, J. y Hancock, L. E. (2009). A fratricidal mechanism is responsible for eDNA release and contributes to biofilm development of *Enterococcus faecalis*. *Mol. Microbiol.* 72:1022-1036.
- Todorov, S. D. y Dicks L. M. T. (2005). Characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from spoiled black olives. *J. Basic Microbiol.* 45:312-322.
- Toledo-Arana, A., Valle, J., Solano, C., Arrizubieta, M. J., Cucarella, C., Lamata, M., Amorena, B., Leiva, J., Penadés, J. R. y Lasa, I. (2001). The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4538-4545.
- Tsai, J.-S., Chen, T.-J., Pan, B. S., Gong, S.-D. y Chung, M.-Y. (2008). Antihypertensive effect of bioactive peptides produced by protease-facilitated lactic acid fermentation of milk. *Food Chem.* 106:552-558.
- Tsai, C.-C., Huang, L.-F., Lin, C.-C. y Tsen, H.-Y. (2004). Antagonistic activity against *Helicobacter pylori* infection in vitro by a strain of *Enterococcus faecium* TM39. *Int. J. Food Microbiol.* 96:1-12.
- Tuler, T. R., Callanan, M. J. y Klaenhammer, T. R. (2002). Overexpression of peptidases in *Lactococcus* and evaluation of their release from leaky cells. *J. Dairy Sci.* 85:2438-2450.
- Turk, B. (2006). Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5:785-799.
- Turner, A. J., Isaac, R. E. y Coates, D. (2001). The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. *Bioessays* 23:261-269.
- Tynkkynen, S., Buist, G., Kunji, E., Kok, J., Poolman, B., Venema, G. y Haandrikman, A. (1993). Genetic and biochemical characterization of the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 175:7523-7532.
- Ueno, K., Mizuno, S. y Yamamoto, N. (2004). Purification and characterization of an endopeptidase that has an important role in the carboxyl terminal processing of antihypertensive peptides in *Lactobacillus helveticus* CM4. *Let. Appl. Microbiol.* 39:313-318.
- Unger, T. (2002). The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *Am. J. Cardiol.* 89:3-10.
- Vahjen, W., Taras, D. y Simon, O. (2007). Effect of the probiotic *Enterococcus faecium* NCIMB10415 on cell numbers of total *Enterococcus* spp., *E. faecium* and *E. faecalis* in the intestine of piglets. *CIIM. Curr. Iss. Intest. Microbiol.* 8:1-7.
- van de Guchte, M., van der Vossen, J. M., Kok, J., Venema, G. (1989). Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:224-228.

- Van der Ven, C., Gruppen, H., de Bont, D. B. A. y Voragen, A. G. J. (2002). Optimization of the angiotensin converting enzyme inhibition by whey protein hydrolysates using response surface methodology. *Int. Dairy J.* 12:813-820.
- Van der Vossen, J. M. B. M., Van der Lelie, D., Venema, G. y Kok, J. (1987). Isolation and characterization of *Streptococcus cremoris* Wg2-specific promoters. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2452-2457.
- Van Der Zander, K., Bots, M. L., Bak, A. A. A., Koning, M. M. G. y De Leeuw, P. W. (2008). Enzymatically hydrolyzed lactotripeptides do not lower blood pressure in mildly hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 88:1697-1702.
- Van Mierlo, L. A. J., Koning, M. M. G., Van Zander, K. D. y Draijer, R. (2009). Lactotripeptides do not lower ambulatory blood pressure in untreated whites: Results from 2 controlled multicenter crossover studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 89:617-623.
- van Schaik, W., Top, J., Riley, D. R., Boekhorst, J., Vrijenhoek, J. E. P., Schapendonk, C. M. E., Hendrickx, A. P. A., Nijman, I. J., Bonten, M. J. M., Tettelin, H. y Willems, R. J. L. (2010). Pyrosequencing- based genome analysis of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium* and identification of a large transferable pathogenicity island. *BMC Genomics* 11:239-246.
- van Schaik, W. y Willems, R. J. L. (2010). Genome-based insights into the evolution of enterococci. *Clin. Microbiol. Infect.* 16:527-532.
- Vasiljevic, T. y Shah, N. P. (2008). Probiotics-From Metchnikoff to bioactives. *Int. Dairy J.* 18:714-728.
- Vaughan, E. E., de Vries, M. C., Zoetendal, E. G., Ben-Amor, K., Akkermans, A. D. y de Vos, W. M. (2002). The intestinal LABs. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82:341-52.
- Vergis, E. N., Shankar, N., Chow, J. W., Hayden, M. K., Snyderman, D. R., Zervos, M. J., Linden, P. K., Wagener, M. M. y Muder, R. R. (2002). Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. *Clin. Infect. Dis.* 35:570-575.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F. y Debevere, J. (2004). Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 96:149-164.
- Vermeirssen, V., Van Camp, J. y Verstraete, W. (2002). Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. *J. Biochem. Biophys. Methods* 51:75-87.
- Walsh, D. J., Bernard, H., Murray, B. A., MacDonald, J., Pentzien, A.-K., Wright, G. A., Wal, J.-M., Struthers, A. D., Meisel, H. y FitzGerald, R. J. (2004). In vitro generation and stability of the lactokinin β -Lactoglobulin fragment (142-148). *J. Dairy Sci.* 87:3845-3857.
- Walstra, P. y Jenness, R. (1984). Outline of milk composition and structure. En *Dairy Chemistry and Physics*, pp: 1-11. Editado por: John Wiley and sons. Nueva York, EEUU.
- Waters, C. M., Antiporta, M. H., Murray, B. E. y Dunne, G. M. (2003). Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. *J. Bacteriol.* 185:3613-3623.
- Wei, L., Alhenc-Gelas, F., Corvol, P. y Clauser, E. (1991). The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. *J. Biol. Chem.* 266:9002-9008.
- Werner, G., Coque, T. M., Hammerum, A. M., Hope, R., Hryniewicz, W., Johnson, A., Klare, I., Kristinsson, K. G., Leclercq, R., Lester, C. H., Lillie, M., Novais, C., Olsson-Liljequist, B., Peixe, L. V., Sadowy, E., Simonsen, G. S., Top, J., Vuopio-Varkila, J., Willems, R. J., Witte, W. y Woodford, N. (2008). Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Eurosurveillance* 13:1-11.
- Werner, G., Fleige, C., Geringer, U., van Schaik, W., Klare, I. y Witte, W. (2011). IS element IS16 as a molecular screening tool to identify hospital-associated strains of *Enterococcus faecium*. *BMC Infect. Dis.* 11:80.
- WHO (2010). Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles 2010. Resumen de orientación. World Health Organization Editions. Ginebra, Suiza.
- WHO/FAO. CODEX STAN 206-1999. Codex General Standard for the use of dairy terms.
- Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C. y Mattick, J. S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295:1487.

- Whitney, R. M. (1988). Proteins of milk. En *Fundamental of dairy chemistry*, pp. 81-169. Editado por: Wong, N.P. Van Nostrand Reinhold. Nueva York, EEUU.
- Wijesekara I. y Kim, S-K. (2010). Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors from marine resources: prospects in the pharmaceutical industry. *Mar. Drugs*. 8:1080-1093.
- Willems, R. J. L., Hanage, W. P., Bessen, D. E. y Feil, E. J. (2011). Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 35:872-900.
- Willems, R. J., Homan, W., Top, J., van Santen-Verheuve, M., Tribe, D., Manziros, X., Gaillard, C., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Mascini, E. M., van Kregten, E., van Embden, J. D. y Bonten, M. J. (2001). Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. *Lancet* 357:853-855.
- Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S. M., Seifert, H., Wenzel, R. P. y Edmond, M. B. (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis.* 39:309-317.
- Witte, W., Wirth, R. y Klare, I. (1999). Enterococci. *Chemotherapy* 45:135-145.
- Wu, J. P., Aluko, R. E. y Nakai, S. (2006). Structural requirements of antitensin I-converting enzyme inhibitory peptides: Quantitative structure-activity relationship study of di- and tripeptides. *J. Agric. Food Chem.* 54:732-738.
- Wyvratt, M. J. y Pratchett, A. A. (1985). Recent developments in the design of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Med. Res. Rev.* 5:483-531.
- Xu, J. Y., Qin, L. Q., Wang, P. Y., Li, W. y Chang, C. (2008). Effect of milk tripeptides on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition* 24:933-940.
- Yamamoto, N., Akino, A. y Takano, T. (1994). Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.* 77:917-922.
- Yamamoto, N., Maeno, M. y Takano, T. (1999). Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *J. Dairy Sci.* 82:1388-1393.
- Zhao, Y. y Jensen, O. N. (2009). Modification-specific proteomics: strategies for characterization of post-translational modifications using enrichment techniques. *Proteomics* 9:4362-4641.

Apéndices

APÉNDICE 1: LISTADO DE ABREVIATURAS.

Abreviaturas generales.

α_{S1} -CN:	α_{S1} -caseína
α_{S2} -CN:	α_{S2} -caseína
α -La:	α -lactoalbúmina
β -CN:	β -caseína
β -Lg:	β -lactoglobulina
κ -CN:	κ -caseína
aa:	Aminoácido/s
ABTS:	2,2'-azino-bis[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid
ACE:	Del inglés <i>Angiotensin convertin enzyme</i>
ACE-IA:	Del inglés <i>ACE-inhibitory activity</i>
ACE-IP:	Del inglés <i>ACE-inhibitory peptide</i>
ADN:	Ácido desoxiribonucleico
ADT:	Test de difusión en agar, del inglés <i>Agar Diffusion Test</i>
AI-ECA:	Actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina
Amp:	Ampicilina
ATP:	Del inglés <i>Adenosine Triphosphate</i>
BAL:	Bacterias ácido lácticas
Bp:	Pares de bases, del inglés <i>Base pairs</i>
BSA:	Seroalbúmina bovina
CIH	Cromatografía de interacción hidrofóbica
Cm:	Cloranfenicol, del inglés <i>Cloramphenicol</i>
CMI:	Concentración mínima inhibitoria
ECA:	Enzima convertidora de la angiotensina
ELISA-CI:	Ensayo Inmunoenzimático Competitivo Indirecto
Em:	Eritromicina, del inglés <i>Erythromycin</i>
EN:	Endopeptidasa neutra
GeIE:	Gelatinasa
GRAS:	Del inglés <i>Generally Recognized as Safe</i>
GM17:	Medio M17 con glucosa
HHL:	Hipuril-Histidil-Leucina
HIC	Del inglés <i>Hydrophobic Interaction Chromatography</i>
HPLC:	Del inglés <i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
HTA:	Hipertensión arterial
IC ₅₀ :	Concentración necesaria de un compuesto para inhibir el 50% de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina
IgG:	Inmunoglobulina G
IgA:	Inmunoglobulina A
IgM:	Inmunoglobulina M
kb:	Kilobases
kDa:	Kilodalton
KLH:	Del inglés <i>Keyhole Limpet Hemocyanin</i>
LB:	Luria-Bertany (medio de cultivo)

LDV:	Leche desnatada de vaca
LF:	Lactoferrina
MALDI-TOF:	Del inglés <i>Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight</i>
MLST:	Del inglés <i>Multilocus sequence typing</i>
MRS:	Man, Rogosa y Sharpe (medio de cultivo)
MS:	Espectrometría de masas, del inglés <i>Mass spectrometry</i>
NICE:	Del inglés <i>Nisin Controlled Expression System</i>
NisA	Nisina A
OD₆₀₀:	Del inglés <i>Open Reading Frame</i>
PA:	Presión arterial
PAD:	Presión arterial diastólica
PAS:	Presión arterial sistólica
Pb:	Pares de bases
PCR:	Del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFGE	Cromatografía en gel en campo pulsante, del inglés <i>Pulsed field gel chromatography</i>
PI-ECA:	Péptido inhibidor de la ECA
PPC:	Proteinasa ligada a la pared celular
QPS:	Del inglés <i>Qualified Presumption of Safety</i>
QSAR:	Modelos de relación estructura-actividad cuantitativos. Del inglés <i>Quantitative Structure Activity Relationship</i>
RP-HPLC:	Cromatografía líquida de alta resolución por columnas cromatográficas con matrices de fase inversa, del inglés <i>Reverse Phase- High Performance Liquid Chromatography</i>
Rt:	Tiempo de retención, del inglés <i>Retention time</i>
SDS-PAGE:	Del inglés <i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SHR:	Ratas espontáneamente hipertensas. Del inglés <i>Spontaneously Hypertensive Rats</i> .
SprE:	Serina proteasa
SRA:	Sistema renina-angiotensina
ST:	Secuencia tipo, del inglés <i>Sequence type</i>
TFA:	Ácido trifluoroacético, del inglés <i>Trifluoroacetic Acid</i>
TH:	Todd-Hewitt (medio de cultivo)

Abreviaturas de nucleótidos.

A (AMP)	Adenina monofosfato o ácido adenílico
C (CMP)	Citosina monofosfato o ácido citidílico
G (GMP)	Guanosina monofosfato o ácido guanidílico
T (TMP)	Timidina monofosfato o ácido timidílico
U (UMP)	Uridina monofosfato o ácido uridílico

Abreviaturas y masa molecular de los aminoácidos.

Aminoácidos	Abreviaturas		Masa molecular (Da)
No modificados postraduccionalmente			
Ácido aspártico	Asp	D	133
Ácido glutámico	Glu	E	147
Alanina	Ala	A	89
Arginina	Arg	R	174
Asparagina	Asn	N	132
Cisteína	Cys	C	121
Fenilalanina	Phe	F	165
Glicina	Gly	G	75
Glutamina	Gln	Q	146
Histidina	His	H	155
Isoleucina	Ile	I	131
Leucina	Leu	L	131
Lisina	Lys	K	146
Metionina	Met	M	149
Prolina	Pro	P	115
Serina	Ser	S	105
Tirosina	Tyr	Y	181
Treonina	Thr	T	119
Triptófano	Trp	W	204
Valina	Val	V	117
Modificados postraduccionalmente			
Dehidroalanina	Dha	-	-
Dehidrobutirina	Dhb	-	-
Lantionina	Lan	-	-
β-metil-lantionina	MeLan	-	-

APÉNDICE 2: LISTADO DE TABLAS

Capítulo 2		Pág.
Tabla 2.1	Composición de la leche (g/100g) de diferentes especies de mamíferos	16
Tabla 2.2	Proteínas de la leche de vaca y algunas de sus propiedades	16
Tabla 2.3	Definiciones y clasificaciones de las cifras de presión arterial (PA) (mmHg)	20
Tabla 2.4	Actividad inhibidora de la ECA y actividad antihipertensiva en SHR de péptidos derivados de proteínas lácteas mediante procesos de hidrólisis enzimática	28
Tabla 2.5	Actividad inhibidora de la ECA y actividad antihipertensiva en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) de péptidos derivados de proteínas lácteas obtenidos por fermentación bacteriana	33
Tabla 2.6	Contribución de las BAL y otros microorganismos a la producción de diversos alimentos fermentados	40
Tabla 2.7	Requisitos recomendados para la selección de cepas probióticas con aplicación comercial	43
Tabla 2.8	Especies incluidas en el género <i>Enterococcus</i>	51
Tabla 2.9	Principales factores potenciales de virulencia del género <i>Enterococcus</i>	56
Capítulo 3 / Chapter 3		
Table 3.1	Lactic acid bacteria (LAB) strains evaluated in this study	70
Table 3.2	ACE-inhibitory activity (ACE-IA) ^a of supernatants of <i>E. faecalis</i> strains grown in BSM	75
Table 3.3	Major peptide fragments in supernatants of <i>E. faecalis</i> strains grown in BSM	76
Table 3.4	PCR amplification of genes related to potential virulence factors in <i>E. faecalis</i> strains with ACE-inhibitory activity (ACE-IA)	78
Table 3.5	ACE-inhibitory activity (ACE-IA) ^a of supernatants of <i>E. faecalis</i> strains grown in BSM	80
Table 3.6	ACE-inhibitory activity (ACE-IA) ^a of supernatants of <i>E. faecalis</i> strains grown in bovine skim milk (BSM), at 37 °C during 48 h, and filtered through <3 kDa cut-off membrane filters	80
Table 3.7	Major peptide fragments in supernatants of <i>E. faecalis</i> strains grown in bovine skim milk (BSM), at 37 °C during 48 h, and filtered through <3 kDa cut-off membrane filters	81
Capítulo 4 / Chapter 4		
Table 4.1	ACE-inhibitory activity (ACE-IA) ^a of supernatants of recombinant <i>L. lactis</i> strains grown in bovine skim milk (BSM)	100
Table 4.2	Major peptide fragments in the bovine skim milk (BSM)-derived hydrolysates of <i>L. lactis</i> IL1403 (pMLG2) after controlled release of EnIA	102

Capítulo 5 / Chapter 5

Table 5.1	Bacterial strains and plasmids used in this study	113
Table 5.2	Primers and PCR products used in this study	115
Table 5.3	ACE-inhibitory activity (ACE-IA) ^a of supernatants of recombinant <i>Enterococcus</i> spp. strains grown in bovine skim milk (BSM)	119
Table 5.4	Major peptide fragments in supernatants of recombinant <i>Enterococcus</i> spp. strains grown in bovine skim milk (BSM)	121

Capítulo 6 / Chapter 6

Table 6.1	Bacterial strains and plasmids used in this study	137
Table 6.2	ACE-inhibitory activity (ACE-IA) ^a of supernatants of recombinant <i>Lb. casei</i> CECT475 derivatives grown at 37 °C in bovine skim milk (BSM)	143
Table 6.3	Major peptide fragments in supernatants of recombinant <i>Lb. casei</i> CECT475 derivatives grown at 37 °C in bovine skim milk (BSM)	145
Table 6.4	ACE-inhibitory activity (ACE-IA) ^a and amount of LHLPLP ^b in supernatants of <i>Lb. casei</i> CECT475 (pCG) and <i>Lb. casei</i> CECT475 (pCGSP) grown at 37 °C in bovine skim milk (BSM)	147

Capítulo 7 / Chapter 7

Table 7.1	Purification of the GelE produced by <i>E. faecalis</i> DBH18 and <i>Lb. casei</i> CECT475 (pCG)	165
Table 7.2	ACE-inhibitory activity (ACE-IA) ^a of bovine skim milk (BSM) fermented with <i>E. faecalis</i> DBH18, <i>Lb. casei</i> CECT475 (pCG) and <i>Lb. casei</i> CECT475 (pMG36c) or incubated with fractions derived from the purification of GelE	168
Table 7.3	Major peptide fragments in bovine skim milk (BSM)-derived hydrolysates with angiotensin-converting enzyme-inhibitory activity (ACE-IA)	169
Table 7.4	ACE-inhibitory activity (ACE-IA) ^a and amount of peptide LHLPLP ^b in bovine skim milk (BSM) incubated with GelE purified from <i>E. faecalis</i> DBH18 and <i>Lb. casei</i> CECT475 (pCG)	170

APÉNDICE 3: LISTADO DE FIGURAS

Capítulo 2		Pág.
Figura 2.1	Esquema de la estructura micelar de las caseínas bovinas	17
Figura 2.2	Características biológicas de los péptidos bioactivos derivados de proteínas lácteas	18
Figura 2.3	Rutas metabólicas implicadas en la regulación de la presión arterial. Los compuestos con función vasodilatadora y vasoconstrictora se indican con los colores verde y rojo, respectivamente	22
Figura 2.4	Reacciones catalizadas por la ECA en los sustratos HHL (A) y o-aminobenzoil-glicil-p-nitrofenilalanil-prolina (B)	24
Figura 2.5	(A) Modelo de interacción del centro activo de la ECA (en rojo) con el fármaco inhibidor Captopril. (B) Unión de un péptido inhibidor de la ECA, análogo a los identificados en el veneno de serpiente (i), y del Captopril (ii) al hipotético centro activo de la ECA (en rojo)	26
Figura 2.6	Unidad monomérica de la variante A de la β -lactoglobulina bovina. La secuencia aminoacídica se encuentra coloreada siguiendo los colores del arcoiris empezando con el extremo N-terminal en azul y terminando con el extremo C-terminal en rojo	31
Figura 2.7.	Esquema del proceso general de elaboración de queso	35
Figura 2.8	Ejemplos de productos comercializados que contienen los péptidos antihipertensivos IPP y VPP	37
Figura 2.9	Distribución genética basada en el análisis comparativo de la secuencia del ARNr 16S de los principales géneros de BAL y de otras bacterias Gram-positivas de los géneros <i>Bifidobacterium</i> y <i>Propionibacterium</i>	39
Figura 2.10	Posibles aplicaciones de las BAL y su bacteriocinas	42
Figura 2.11	Representación esquemática de proteinasas asociadas a la pared celular (PPCs) de distintas BAL	46
Figura 2.12	Representación esquemática del modo de acción del sistema proteolítico de los lactococos en las caseínas	47
Figura 2.13	Formación de “biofilms” en membranas de nitrocelulosa por una cepa de <i>E. faecium</i> con delección del gen <i>esp</i> (A) y por la correspondiente cepa salvaje (B). Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía confocal láser de barrido (CLSM, del inglés <i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i>) tras la tinción de la muestra con naranja de acridina	58
Figura 2.14	Representación esquemática de las proteínas de superficie y de los filamentos de superficie “pili” de los enterococos e indicación de su función durante la infección de sus hospedadores	59
Figura 2.15	Operón de la citolisina de <i>E. faecalis</i> y mecanismo implicado en su síntesis, transporte, maduración, inmunidad y regulación de su producción	61
Figura 2.16	Mapa genético de los genes <i>fsrABCD</i> y del operón <i>gelE-sprE</i>	62

Capítulo 3 / Chapter 3

Figure 3.1	Antimicrobial activity of supernatants of <i>E. faecalis</i> strains grown in MRS (A and C) and BSM (B and D) as determined by an agar well diffusion test (ADT) with <i>P. damnosus</i> CECT4797 (A and B) and <i>L. ivanovii</i> CECT913 (C and D) as the indicator microorganisms. Supernatants of: <i>E. faecalis</i> BCS53 (1); <i>E. faecalis</i> CECT184 (2); <i>E. faecalis</i> CGV67 (3); <i>E. faecalis</i> DBH18 (4); <i>E. faecalis</i> LG101 (5); <i>E. faecalis</i> QA12 (6); <i>E. faecalis</i> QA21 (7); <i>E. faecalis</i> QA53 (8); <i>E. faecalis</i> QF386 (9); <i>E. faecalis</i> QM38 (10); <i>E. faecalis</i> SDM37 (11); <i>E. faecalis</i> SDP10 (12); and <i>E. faecalis</i> SMF54 (13)	77
Figure 3.2	Dendrogram based on the Dice's coefficient showing the genetic relatedness among <i>E. faecalis</i> based on PFGE- <i>Sma</i> I digestion patterns	79

Capítulo 4 / Chapter 4

Figure 4.1	Reduction of the optical density of the recombinant <i>L. lactis</i> NZ9000 (A) and <i>L. lactis</i> IL1403 cultures (B), after induction with nisin during growth in GM17. Growth after induction with nisin was measured at (□) 0 min, (■) 90 min and (■) 180 min	99
Figure 4.2	Growth of <i>L. lactis</i> NZ9000 (pMSP3545) (I), <i>L. lactis</i> NZ9000 (pMLG2) (II), <i>L. lactis</i> IL1403 (pMSP3545) (III) and <i>L. lactis</i> IL1403 (pMLG2) (IV) cultures, after induction with nisin during growth in bovine skim milk (BSM), and expressed as colony forming units per milliliter (A) and percentage of viable cells (B)	100
Figure 4.3	Peptide profiles by RP-HPLC of the <i>L. lactis</i> NZ9000 (pMLG2) cultures after 0 (A), 24 (B) and 48 h (C) of induction with nisin, and of the <i>L. lactis</i> IL1403 (pMLG2) cultures after 0 (D), 24 (E) and 24 h (F) induction with nisin, during growth in bovine skim milk (BSM)	101

Capítulo 5 / Chapter 5

Figure 5.1	Gelatin (A) and bovine casein hydrolysis (B) by <i>E. faecalis</i> strains of food, environmental and clinical origin grown in Todd Hewitt-gelatin (TH-GEL) and Todd Hewitt-bovine skim milk (TH-BSM) plates, respectively. (1) <i>E. faecalis</i> DBH18, (2) <i>E. faecalis</i> QA53, (3) <i>E. faecalis</i> P4, (4) <i>E. faecalis</i> P36, (5) <i>E. faecalis</i> 3Er1, and (6) <i>E. faecalis</i> H10	117
Figure 5.2	Caseinolytic activity of recombinant <i>E. faecalis</i> P36, <i>E. faecalis</i> JH2-2, <i>E. faecium</i> AR24, <i>E. hirae</i> AR14, <i>E. faecalis</i> DBH18 and <i>E. faecalis</i> V583 Δ <i>gelE</i> strains transformed with plasmids pMG36c, pCG, pCGSP and pCSP	118
Figure 5.3	Peptide profiles by RP-HPLC of supernatants of <i>E. faecalis</i> P36 (pCG) (A to D) and <i>E. faecalis</i> P36 (pCGSP) (E to H) grown in bovine skim milk (BSM) for 0 h (A, E), 24 h (B, F) 48 h (C, G) and 96 h (D, H)	120
Figure 5.4	Location of the major peptides (doubled-ended arrows) identified in the	126

primary sequences of β -casein (A) and α_{s1} -casein (B) present in bovine skim milk (BSM)-derived hydrolysates originated by the gelatinase (GelE) produced by recombinant *Enterococcus* spp. encoding *gelE* and *sprE* from *E. faecalis* DBH18

Capítulo 6 / Chapter 6

Figure 6.1	Caseinolytic activity of LAB transformed with plasmids pMG36c, pCG and pCGSP in Todd Hewitt-bovine skim milk (TH-BSM) plates	141
Figure 6.2	Determination of the pH and ACE-inhibitory activity of bovine skim milk (BSM)-derived samples from <i>Lb. casei</i> CECT475 (pMG36c) —, <i>Lb. casei</i> CECT475 (pCG) . . . , and <i>Lb. casei</i> CECT475 (pCGSP) _ _ _ grown in BSM at 33 °C (A), 37 °C (B) and 40 °C (C). The ACE-IA of milk samples from <i>Lb. casei</i> CECT475 (pCG) and <i>Lb. casei</i> CECT475 (pCGSP) is shown in light and dark grey columns, respectively	142
Figure 6.3	Peptide profiles by RP-HPLC of BSM-derived hydrolysates from <i>Lb. casei</i> CECT475 (pCG) (A to D) and <i>Lb. casei</i> CECT475 (pCGSP) (E to H) after 0 h (A and E), 12 h (B and F), 24 h (C, G) and 48 h (D and H) of growth at 37 °C	144
Figure 6.4	(A) NCI-ELISA for detection of LHLPLP in purified bovine β -casein (○), bovine skim milk (BSM) (●) and purified bovine κ -casein (x). (B) CI-ELISA for detection and quantification of LHLPLP (■) and LHLPLPL (□)	146

Capítulo 7 / Chapter 7

Figure 7.1	Growth of <i>E. faecalis</i> DBH18 in GM17 (A) and <i>Lb. casei</i> CECT475 (pCG) in MRS (B), as measured by the optical density (OD) of the samples at 600 nm (●). The proteolytic activity of the cell-free supernatants was determined by the Hide Powder Azure (HPA) method (✕)	163
Figure 7.2	Caseinolytic activity in bovine skim milk agar (BSMA) plates of fractions resulting from the purification of GelE from <i>E. faecalis</i> DBH18 and <i>Lb. casei</i> CECT475 (pCG). The <i>Lb. casei</i> CECT475 (pMG36c) culture was used as the non-producer GelE control strain	164
Figure 7.3	Coomassie blue-stained SDS/PAGE gel showing protein bands from purified fractions resulting from purification of the GelE from <i>E. faecalis</i> DBH18 (lanes 1 and 2) and <i>Lb. casei</i> CECT475 (pCG) (lanes 3 and 4). <i>Lb. casei</i> CECT475 (pMG36c) was used as the non-producer GelE control strain (lanes 5 and 6). Samples in lanes 1, 3 and 5 correspond to the ammonium sulfate precipitation fractions (5 μ l), and samples in lanes 2, 4 and 5 correspond to the dialyzed and concentrated fractions from the hydrophobic interaction chromatography eluates with high proteolytic activity (5 μ l). With asterisk (*), protein bands submitted to MALDI-TOF/MS analysis. M, molecular weight markers, with sizes (in kDa) given in the left margin.	166

Figure 7.4	Location of major peptide fragments (double-ended arrows) identified by MALDI-TOF/MS after in-gel tryptic digestion of the dialyzed and concentrated samples of the GelE purified from <i>E. faecalis</i> DBH18 and <i>Lb. casei</i> CECT475 (pCG). Discontinuous double-ended arrows may correspond to peptides resulting from the autocatalytic activity of the purified GelE. All identified peptides corresponded to mature GelE. The N-terminal signal peptide of the GelE is in bold and its prosequence in italics	167
-------------------	---	-----

Capítulo 8

Figura 8.1	Espectro por RP-HPLC-MS/MS del péptido LHLPLP (m/z 689,4) (A). Espectro del ión m/z 689,4 cargado (B). La secuencia aminoacídica del péptido LHLPLP se deduce del tamaño molecular de los fragmentos iónicos observados en el espectro	181
Figura 8.2	Mapa genético del plásmido pMLG2, derivado del vector de expresión proteica pMSP3545 con el promotor P_{nisA} inducible por la nisina A (NisA), el gen que codifica la enterolisina A (EnlA) y los genes que codifican las proteínas NisR y NisK de regulación de la síntesis de EnlA por la NisA	186
Figura 8.3	Construcción de los plásmidos recombinantes pCG, pCSP y pCGSP, derivados del vector de expresión pMG36c	192
Figura 8.4	Análisis por RP-HPLC-MS/MS (m/z 350-1300) de los hidrolizados lácteos generados por las cepas recombinantes de <i>E. faecalis</i> DBH18 (A), <i>E. faecalis</i> JH2-2 (pCG) (B), <i>E. faecalis</i> P36 (pCG) (C), <i>E. faecium</i> AR24 (pCG) (D) y <i>E. hirae</i> AR14 (pCG) (E), tras 48 h de desarrollo en leche desnatada de vaca (LDV)	196
Figura 8.5	Resultado de una prueba de ELISA-CI para la identificación y cuantificación del péptido antihipertensivo LHLPLP. En las filas 1 y 2 se depositan concentraciones conocidas decrecientes del péptido sintético LHLPLP. En las filas 3, 4 y 5, 6 se muestran diluciones decrecientes, por duplicado, de las muestras problema correspondientes a las fracciones de <3 KDa de los hidrolizados lácteos de interés. A mayor intensidad de color, menor concentración del péptido LHLPLP	200

*Los codones de terminación de la traducción se indican con un asterisco

